ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. VII No 1

1 9 5 8

NCP
RAM
COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
10 DEC 1958

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. VII No 1

1958
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek-korespondent PAN — Lublin, Kazimierz Bassalik, członek rzeczywisty PAN — Warszawa, Józef Heller, członek-korespondent PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Wrocław, Eugeniusz Pijanowski członek-korespondent PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Dział ogólny — Z. Lorkiewicz, Lublin
Dział rolny — J. Gołębiowska, Poznań
Dział przemysłowy — J. Jakubowska, Łódź

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE – WROCŁAW 1958

Nakład 1146+104 egz.	*Oddano do składania 19. III. 1958 r.*
Ark. wyd. 7,5, druk. 6,5	*Podpisano do druku 11. IX. 1958 r.*
Pap. druk. sat. kl. III, 80 g+kreda 90 g	*Druk ukończono we wrześniu 1958 r.*
Cena zł 25.–	*Zam. nr 89/58 – P-2*

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 3-10

R. Stupnicki

ANALIZA PEWNYCH KRZYWOLINIOWYCH TESTÓW MIKROBIOLOGICZNYCH

Z Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Bydgoszczy oraz z Zakładu Higieny Zwierząt Instytutu Weterynarii w Bydgoszczy

Wpłynęło dnia 20 listopada 1957 r.

Użycie drobnoustrojów do ilościowego oznaczania związków, zwłaszcza biologicznie czynnych, jak witaminy, aminokwasy i in., pozwoliło na znaczne zwiększenie czułości analizy. Dzięki swej prostocie i stosunkowo dużej dokładności metody mikrobiologiczne zyskały wielką popularność.

Znamy wiele metod analizy mikrobiologicznej. W bieżącej pracy omówione będą wyłącznie testy oparte na porównaniu wzrostu drobnoustroju na podłożu zawierającym badany materiał biologiczny ze wzrostem w obecności czystej substancji wzorcowej, której zawartość w materiale biologicznym chcemy oznaczyć. Warunki testu dobiera się zazwyczaj tak, aby wykres przedstawiający zależność wzrostu zarazka od stężenia w podłożu substancji wzorcowej (standardu), jak również materiału biologicznego (próby) był linią prostą. (W o o d, 1955). Ogólnym równaniem linii prostej jest wzór (1)

$$y = a + bx. \tag{1}$$

Jeżeli statystycznie lub graficznie wyznaczy się takie równania osobno dla standardu i prób, łatwo można obliczyć zawartość badanego czynnika w materiale biologicznym. Należy w tym celu podzielić współczynnik b próby (b_p) przez b standardu (b_s). Otrzyma się wówczas wynik w takich jednostkach, jakich użyto do obliczeń, np. w μg/g. Dla obliczenia współczynnika b można posłużyć się wzorem (2)

$$b = \frac{\sum xy - \bar{x}\sum y}{\sum x^2 - \bar{x}\sum x}, \tag{2}$$

gdzie y oznacza średnią z kilku równoległych powtórzeń danego stężenia.

W wielu przypadkach zależność wzrostu od stężenia badanej substancji ma charakter krzywoliniowy; staramy się wówczas tak przekształcić wyniki, aby otrzymać wykres prostoliniowy. Postępowanie takie nazywa się anamorfozą krzywej.

W celu przekształcenia krzywej na prostą można „dopasować" ją do jakiejś znanej funkcji elementarnej, np. logarytmicznej lub wykładniczej. Najprostszym sposobem jest sporządzenie wykresu na papierze półlogarytmicznym (o siatce logarytmicznej na osi y i zwykłej, milimetrowej, na osi x); matematycznie należy traktować dane doświadczalne jako logarytmy liczb i do obliczeń użyć antylogarytmów tych danych.

Nie należy wykreślać danych na papierze logarytmicznym (o obu skalach logarytmicznych), gdyż wówczas obliczając stosunek b_P/b_s otrzyma się wynik nie w jednostkach, np. μg/g, a w logarytmach tych jednostek, co oczywiście zmienia całkowicie wynik.

Można wreszcie otrzymać krzywe wzrostowe, które nie dadzą się wyprostować na wymienionych papierach. Krzywe takie uzyskała m. in. Zalewska * (1958), oznaczając w wątrobie i surowicy zawartość kwasu foliowego przy użyciu *Streptococcus faecalis* (nefelometrycznie) i *Lactobacillus casei* (acydymetrycznie).

W celu umożliwienia obliczeń testów, których wykresem są krzywe nie dające się wyprostować na papierze półlogarytmicznym, opracowano prostą metodę, opartą na anamorfozie graficznej (Łukaszewicz i Warmus, 1956). Pozwala ona wyprostować dowolną krzywą, stale rosnącą, względem pewnego układu odniesienia. W przekształceniu logarytmicznym takim układem odniesienia jest krzywa logarytmiczna; przy pomocy jej równania wyznacza się skalę papieru logarytmicznego. Gdy natomiast mamy do czynienia z krzywymi wzrostowymi nielogarytmicznymi, układ odniesienia stanowić będzie krzywa standardowa. W stosunku do niej przekształcić można wszystkie krzywe prób, a także samą krzywą standardową.

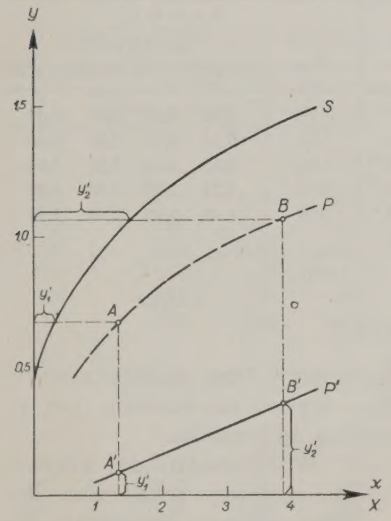
Zasadę metody ilustruje rys. 1: rysuje się krzywą standardową (czyli zależność wzrostu zarazka od stężenia substancji wzorcowej) na papierze milimetrowym (rys. 1, S), następnie dane, które mają być przekształcone (rys. 1, AB), zaznacza się na osi y i odmierza odległości między tymi punktami a krzywą standardową (rys. 1, y').

Odległości te służą jako nowe, wtórne wartości (y'), które zastępują pierwotne dane. Ponieważ mierzymy je równolegle do osi x, zatem wyrażamy je w jednostkach stężeń standardu. Owe wtórne wartości układają się w przybliżeniu po linii prostej (rys. 1, P'), którą można wykreślić graficznie lub wyznaczyć statystycznie. W ten sposób przekształcić należy

* Z Zakładu Higieny Zwierząt Instytutu Weterynarii w Bydgoszczy.

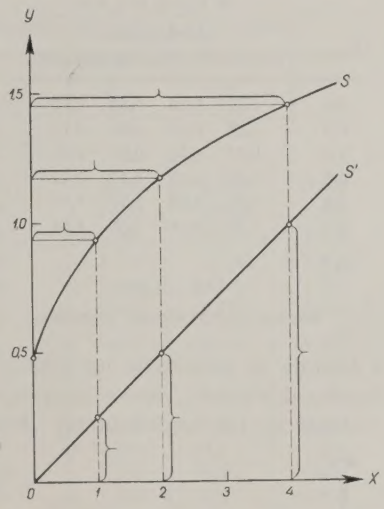
najpierw krzywą standardową w stosunku do siebie samej (rys. 2, S). Otrzyma się wówczas prostą przechodzącą przez początek układu współrzędnych i nachyloną do obu osi pod kątem 45° (rys. 2, S').

Taka prosta posiada równanie $y' = X$, a więc jej współczynnik kierunkowy $b = 1$. Stworzony został zatem nowy układ współrzędnych: y'/x, w którym oś odciętych ma jak uprzednio dwie skale — dla standardu (X) oraz dla prób (x), oś rzędnych zaś wyskalowana jest w jednostkach standardu (X) (rys. 3).



Rys. 1. Przekształcenie krzywej próby (P) na prostą (P') w stosunku do krzywej standardowej (S). Pokazano na przykładzie 2 punktów

Abb. 1. Umwandlung einer Testkurve (P) in die Gerade (P') mittels der Standardkurve (S). Nur zwei Punkte als Beispiel gezeigt



Rys. 2. Przekształcenie krzywej standardowej (S) w stosunku do siebie samej na prostą (S')

Abb. 2. Selbstumwandlung der Standardkurve (S) in die Gerade (S')

Zamieszczony przykład i opis jednej z analiz pozwoli na dokładniejsze zorientowanie się w stosowaniu podanej metody *.

Nastawiono serię probówek zawierających w pożywce dodatek kwasu foliowego w ilościach od 0 do 4 mμg na probówkę oraz serię z dodatkiem miazgi wątroby w ilościach od 17 do 136 μg na probówkę. Każde

* Ponieważ praca ta ma na celu wyłącznie podanie metodyki obliczeń, przeto pominięte w niej są wszelkie szczegóły dotyczące techniki mikrobiologicznej.

stężenie (poziom) nastawiono w 4 powtórzeniach; po okresie inkubacji mierzono w każdej probówce nefelometrycznie stopień zmętnienia (*E*) (tab. I). Dla każdego poziomu standardu obliczano średnią z 4 powtórzeń

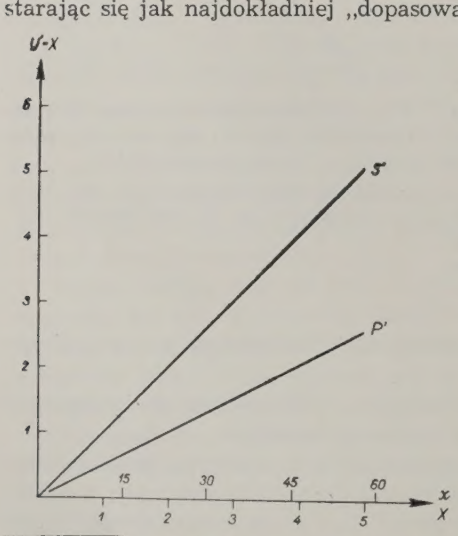
Tabela I

Odczyty nefelometryczne (*E*)
Nefelometrische Ablesungswerte (*E*)

Standard						Próba				
$X_{m\mu g}$	powtórzenia Paralellbestimmungswerte				$E_{śr}$	$x_{\mu g}$	powtórzenia Paralellbestimmungswerte			
0,0	0,33	0,35	0,36	0,37	0,353	17	0,60	0,60	0,62	0,65
0,5	0,55	0,60	0,65	0,70	0,625	34	0,75	0,77	0,80	0,80
1,0	0,82	0,91	0,95	1,06	0,944 *	68	0,95	0,99	1,00	1,08
2,0	1,40	1,40	1,40	1,42	1,405	102	1,24	1,25	1,25	1,26
3,0	1,50	1,65	1,70	1,70	1,645 *	136	1,40	1,40	1,40	1,40
4,0	1,70	1,80	1,85	1,85	1,800					
10,5						357				
	$\bar{X} = 1{,}750$						$\bar{x} = 71{,}4$			

* Średnie logarytmiczne; omówienie w dyskusji.

i średnie te nanoszono na papier milimetrowy *. Przy pomocy krzywki bardzo dokładnie, cienką linią wykreślano krzywą standardową (rys. 4), starając się jak najdokładniej „dopasować" ją do punktów.



Rys. 3. Prosta standardu (*S'*) i próby (*P'*) w anamorficznie zmienionym układzie współrzędnych

Abb. 3. Standard (*S'*)- und Test (*P'*)-geraden nebeneinander im anamorphisch umgewandeltem Koordinatensystem

W stosunku do krzywej standardowej przeliczano kolejno odczyty wszystkich powtórzeń poszczególnych poziomów próby, sposobem podanym na rysunku 1. W celu maksymalnego wyeliminowania błędu, spowodowanego graficznym wyznaczeniem krzywej standardowej, traktowano stan-

* Jeżeli wartość któregoś z powtórzeń danego poziomu zbyt odbiegła od innych, w celu ewentualnego odrzucenia jej stosowano kryterium rozstępu (Rokosz, 1955), rzadziej kryterium t (Romanowski, 1955).

dard jako jedną z prób. W następstwie tego wszystkie powtórzenia poszczególnych poziomów standardu również przeliczano wobec wykreślonej krzywej standardowej. W wyniku tej poprawki współczynnik b_s różnił się

Tabela II

Wartości E przeliczone na y' wg wykresu na rys. 4

E-Werte umgerechnet mittels des Diagramms von Abb. 4 in y'-Werte.

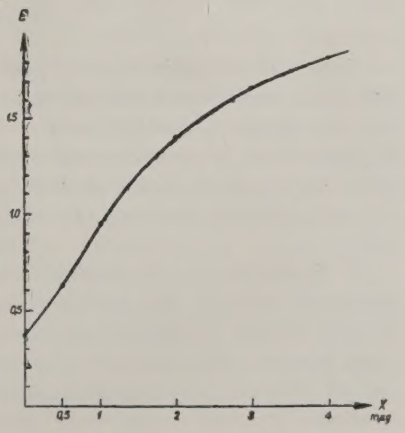
X	Przeliczone powtórzenia Umgerechnete Paralellbestimmungswerte				$y'_{śr}$	Xy'	X^2
			Standard				
0,0	—0,01	0,00	0,02	0,05	0,015	0,000	0,000
0,5	0,39	0,47	0,53	0,61	0,500	0,250	0,250
1,0	0,80	0,94	1,01	1,20	0,987	0,987	1,000
2,0	2,00	2,00	2,00	2,07	2,018	4,036	4,000
3,0	2.38	3,05	3,36	3,36	3,037	9,111	9,000
4,0	3,36	3,95	4,30	4,30	4,023	16,092	16,000
10,5					10,580	30,476	30,250
			Próba				
17	0,47	0,47	0,50	0,53	0,493	8,4	289
34	0,70	0,74	0,77	0,77	0,745	25,3	1156
68	1,01	1,07	1,09	1,24	1,103	75,0	4624
102	1,60	1,62	1,62	1,64	1,620	165,2	10204
136	2,00	2,00	2,00	2.00	2,000	272,0	18496
357					5,961	545,9	34796

$$b_s = \frac{30{,}476 - 1{,}750 \cdot 10{,}580}{30{,}250 - 1{,}750 \cdot 10{,}500} = 1{,}008$$

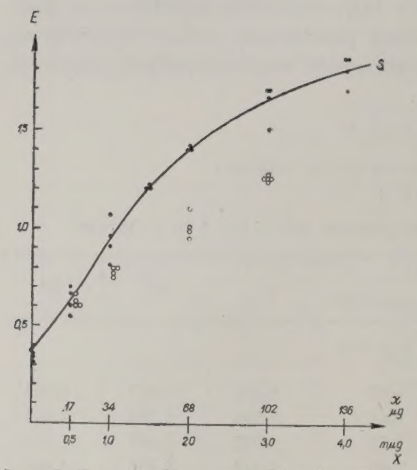
$$b_p = \frac{545{,}9 - 71{,}4 \cdot 5{,}961}{34772 - 71{,}4 \cdot 357} = 0{,}01296$$

$$\frac{b_p}{b_s} = \frac{0{,}01296}{1{,}008} = 0{,}01286 \quad \text{m}\mu\text{g/} \cdot \text{g}$$

Zawartość kwasu foliowego w próbie (wątroba kurczęcia) wynosi 12,9 µg/g świeżej masy.

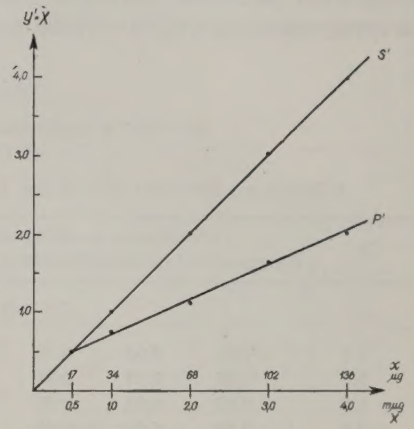


Rys. 4. Krzywa standardowa (do tab. I)
Abb. 4. Standardkurve (zur Tab. I)



Rys. 5. Poszczególne wartości odczytów standardu i próby na tle krzywej standardowej
• punkty standardu, ○ punkty próby

Abb. 5. Sämtliche Ablesungswerte des Standards und der Probe neben der Standardkurve
• Standardspunkte, ○ Probepunkte



Rys. 6. Prosta standardu i próby (do tab. II)

Abb. 6. Standard- und Probe (Test)-geraden (zur Tab. 2)

nieco od jedności, co w obliczeniach uwzględniano. Wszystkie wartości przeliczeń wobec krzywej standardowej wpisywano do tablic (tabela II, rysunek 5 i 6).

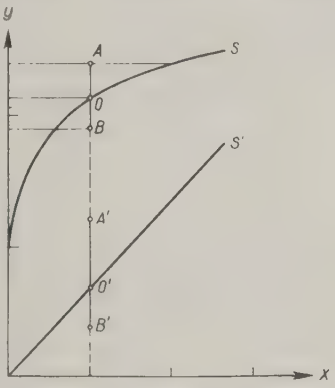
DYSKUSJA

Ponieważ punktem wyjścia przy opisywanej metodzie nie jest przekształcenie analityczne lecz graficzne, zatem ta właśnie czynność — anamorfoza krzywej standardowej — może być źródłem pewnych błędów. Wpływają na to głównie dwa czynniki: niewłaściwe obliczanie średniej przy zbyt dużych różnicach między powtórzeniami lub też zbyt duży rozrzut punktów średnich, utrudniający prawidłowe wykreślenie krzywej.

1. Posługiwanie się średnimi arytmetycznymi powtórzeń przy wykreślaniu krzywej standardowej jest dopuszczalne tylko wówczas, gdy różnice między powtórzeniami danego poziomu nie są duże, w przeciwnym bowiem razie „rzeczywista" średnia może się dość znacznie odchylać od średniej arytmetycznej. Spowoduje to oczywiście błąd przy wykreślaniu krzywej, który może nie być bez znaczenia. Niezgodność śred-

niej arytmetycznej z „rzeczywistą" spowodowana jest krzywizną wykresu. Sprawia ona, że punkty odchylające się o jednakowy odcinek w górę i w dół od krzywej (rys. 7, A B) nie będą po anamorfozie jednakowo odległe od prostej (rys. 7, A' B').

Rzeczywistą średnią można by z łatwością obliczyć, znając *a priori* równanie krzywej standardowej. Ponieważ jest to nieosiągalne, można użyć pewnego przybliżenia, wykorzystując podobieństwo omawianych krzywych do krzywej logarytmicznej. Przybliżeniem takim jest użycie średnich logarytmicznych z wartości powtórzeń. W tym celu należy obliczyć antylogarytmy tych wartości, a następnie ich średnią arytmetyczną. Logarytm jej jest średnią logarytmiczną. Praktycznie: jeżeli różnica między obydwoma rodzajami średnich przekracza na wykresie 0,5 mm, lepiej jest użyć średniej logarytmicznej.



Rys. 7.
Abb. 7.

2. Źródłem poważnych błędów może być zbyt duży rozrzut punktów średnich standardu wokół krzywej. Należałoby wobec tego ograniczyć stosowanie opisanej metody do przypadków, w których krzywą standardową da się dokładnie i jednoznacznie wykreślić. Gdy jednak otrzymane dane nie pozwalają na to, a oznaczenia z różnych względów nie można powtórzyć, należy próbować zwiększyć szanse poprawnego wykreślenia krzywej przez zwiększenie ilości punktów. W tym celu należy nanieść na wykres nie punkty średnie, a wszystkie odczyty standardu i wykreślić prowizoryczną krzywą. Następnie należy dla każdej próby z osobna tak zmienić skalę stężeń na osi x (zachowując proporcjonalność!), aby wszystkie punkty prób znalazły się jak najbliżej prowizorycznie wykreślonej krzywej standardu. Mając do dyspozycji dużą ilość punktów można ze znacznie większym prawdopodobieństwem krzywą tę wykreślić (wymazując uprzednio krzywą prowizoryczną). Postępowanie takie nie pozbawione jest poważnych wad i wyniki otrzymane tą drogą należy oceniać bardzo ostrożnie, stosując analizę statystyczną (B l i s s , 1951).

3. Może się również zdarzyć, że mimo prawidłowego wykreślenia krzywej standardowej przekształcenie krzywych prób nie da w wyniku linii prostych. Wyniki takie nie nadają się do obliczeń, wskazują bowiem, że w grę wchodził jakiś dodatkowy czynnik modyfikujący wzrost bakterii na materiale biologicznym.

WNIOSKI

Metoda ta może być przydatna wszędzie tam, gdzie chodzi o porównywanie między sobą krzywych stale rosnących (krzywe stale malejące można przekształcić na stale rosnące przez obliczenie ich odwrotności), gdy nieznane jest ich równanie matematyczne. Stosując tę metodę do krzywych o znanym równaniu stwierdzono, że przy odpowiednim doborze skal, dokładnym postępowaniu i niewielkim rozrzucie punktów standardu błąd opisanej metody graficznej nie przekracza na ogół 3% rzeczywistej wartości wyniku.

Prof. drowi M. Olekiewiczowi dziękuję za cenne uwagi i okazaną mi pomoc

LITERATURA

Bliss C. I., 1951: Statistical methods in vitamin research. Vitamin Methods, v. II. New York.

Łukaszewicz J. i Warmus M., 1956: Metody numeryczne i graficzne, Warszawa. PWN.

Rokosz A., 1955: Metody statystyczne w analizie chemicznej (III). *Wiadomości Chemiczne*, **9**: 635.

Romanowski W., 1955: Podstawowe zagadnienia teorii błędów. Warszawa. PWN.

Wood E. C., 1945: Calculation of results in microbiological assays. *Nature*. **155**: 632.

Zalewska E., 1958: dane nieopublikowane.

R. Stupnicki

DIE ANALYSE VON NICHTELEMENTAREN KURVEN IN GEWISSEN MIKROBIOLOGISCHEN TESTEN

Zusammenfassung

Es wird eine einfache Methode in Anwendung zur mikrobiologischen Analyse von Folsäure beschrieben, die den Vergleich von nichtelementaren, monotonischen Kurven ermöglicht.

Diese Methode beruht auf einer Transformation der Kurven in die Geraden mittels der graphischen Anamorphose einer von ihnen, die als Standardkurve dienst, und mit der alle anderen vergliechen werden.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 11-16

Z. Lorkiewicz

PŁYNNA POŻYWKA DLA FORM *L PROTEUS MIRABILIS*

Z Zakładu Mikrobiologii Ogólnej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wpłynęło dnia 5 stycznia 1958 r.

Postacie *L* drobnoustrojów wymagają podłoża o określonym składzie i własnościach fizycznych. Czyniono liczne próby aby uzyskać podłoże płynne odpowiednie dla form *L*, ponieważ do badań fizjologicznych, a szczególnie serologicznych, wygodniejsza jest zawiesina otrzymana z hodowli płynnej niż ze stałego podłoża.

Klieneberger (1936) wykazała, że postacie *L Streptobacillus moniliformis*, po 10-15 pasażach na podłożu stałym, można hodować w bulionie z dodatkiem surowicy.

Znacznie trudniej jest namnażać w podłożach płynnych formy *L Bacteroides* i *Salmonella*. Udaje się to tylko w pewnej mierze po dodaniu nieznacznych ilości agaru (0,1-0,2%) do bulionu. Trudności w namnażaniu postaci *L* w płynnym podłożu należy przypisać raczej nieodpowiednim warunkom fizycznym niż brakom substancji odżywczych. Wystarczy przycisnąć do powierzchni kolonii *L* kawałek celofanu lub waty, po czym wrzucić je do bulionu z surowicą, aby uzyskać wzrost (Dienes, 1953).

W roku 1950 Tulasne (Tulasne i współpracownicy, 1950) doniósł o udanych próbach hodowania form *L Proteus* w bulionie z dodatkiem surowicy i penicyliny. Uczony francuski stwierdził też, że zamiast surowicy można użyć laktoflawiny. Do płynnego podłoża wrzucano kawałek agaru z mikrokoloniami *L* i po kilku dniach uzyskiwano wzrost na powierzchni bulionu w postaci kożuszka. Wystarczyło przenieść jedno uszko ezy takiej hodowli, aby po kilku lub kilkunastu dniach (zależnie od wielkości naczynia) powierzchnia bulionu pokryła się kożuszkiem.

Dienes (1953) zastosował modyfikację metody Tulasne'a. Polegała ona na tym, że skośne agary (z dodatkiem penicyliny) z mikrokoloniami *L* typu *B* zalewano bulionem z surowicą i penicyliną. Otrzymywał on

w ten sposób hodowle pływające na powierzchni bulionu w postaci kożuszka. Hodowle te udawało się kilkakrotnie przepasażować na agarze odżywczym bez surowicy. Hodowle otrzymane z płynnego podłoża Dienes traktuje jako postacie odrębne od form *A* i *B*. Jakkolwiek hodowle płynne Dienesa pochodzą z form *B*, to jednak utraciły one zdolność do rewersji. Poza tym wykazywały one mniejsze wymagania wzrostowe od form typu *A* (namnażały się na pożywce bez surowicy).

Abrams (1955) zastosowała płynne podłoże zawierające oprócz mieszanki soli amid kwasu nikotynowego oraz bezwitaminowy wyciąg kazeiny. Po jednym dniu inkubacji hodowlę wstrząsa się i po 3-7 dniach otrzymuje się wzrost postaci *L* w formie jednolitego zmętnienia. Ze względu na homogenność hodowla ta nadaje się do zastosowania przy produkcji antygenu.

BADANIA WŁASNE

Po uzyskaniu pomyślnych wyników w hodowli form *L Proteus vulgaris* na agarze odżywczym z dodatkiem węgla adsorbcyjnego (Lorkiewicz, 1957) autor postanowił przebadać przydatność węgla w podłożach płynnych.

Do badań użyto ustalonej postaci *L 3A Proteus mirabilis* przesianej 130 razy na agarze z dodatkiem surowicy oraz 10 razy na agarze węglowym. Szczep ten namnażał się w bulionie z dodatkiem 10% surowicy końskiej oraz 0,2% agaru. Po kilku dniach widoczne było zmętnienie. Penicylina wpływała ujemnie na namnażanie postaci *L* w tym podłożu.

Równolegle hodowano postacie *L* w bulionie z dodatkiem agaru (0,2%) i węgla adsorpcyjnego (0,5%) zamiast surowicy. W pierwszym przesiewie namnażanie było nieco opóźnione, ale po 12 dniach uzyskano dosyć obfity wzrost powierzchniowy oraz zmętnienie bulionu. Po 2-3 przesiewach w bulionie z węglem postacie *L* namnażały się szybciej i kożuszek pojawiał się w ciągu 6-8 dni. W obrazie kontrastowo-fazowym nie zauważono różnic między elementami postaci *L* z hodowli w bulionie z surowicą i agarem a hodowlą w bulionie z węglem i agarem.

Stopniowo zmniejszano zawartości agaru w bulionie węglowym do 0,1, 0,05 i 0,01%. W końcu użyto bulionu bez dodatku agaru. Formy *L* namnażały się również w bulionie węglowym. Zauważono przy tym, że postacie *L* dostosowują się do nowego podłoża. Wyrażało się to przyspieszeniem wzrostu tak, że kożuszek pojawiał się w ciągu 6-8 dni. Miał on konsystencję śluzowatą, lecz przy wstrząsaniu ulegał łatwo homogenizacji. Zwykle od kożuszka do dna probówki, pokrytego warstwą węgla, zwisało pasmo śluzowate o grubości 2-3 mm. W ciągu pierwszych dwu dni wzrostu można było zauważyć zmętnienie bulionu. W odróż-

nieniu od wyników Tulasne nie było konieczne przeniesienie części kożuszka na powierzchnię bulionu, aby wytworzył się on ponownie. Wystarczyło wsiać uszkc ezy hodowli wstrząśniętej, by po pojawieniu się lekkiego zmętnienia powstało pasmo pionowe oraz nieduże płatki kożuszka, który stopniowo pokrywał całą powierzchnię bulionu. Po kilkunastu dniach kożuszek opadał na dno probówki tworząc szarą warstwę na powierzchni węgla.

W miarę przystosowywania się do bulionu węglowego można było zmniejszać ilość wsiewanych cząsteczek *L*. Po kilkunastu przesiewach hodowle rozcieńczone 10^{-7}, a czasami 10^{-8} dawały jeszcze wzrost w podłożu płynnym oraz kolonie na agarze węglowym. Namnożenie zależy w znacznej mierze od jakości węgla aktywowanego.

Pożywka Medium	Ilość wyrosłych kolonii *L* z 1 ml hodowli Number of *L*-colonies from 1 ml of culture	
	Wsiew bezpośredni Direct inoculum	Po wytrząsaniu Inoculum after shaking
Bulion węglowy Carbon broth		
+ fosforan phoshate	2×10^8	5×10^8
+ 1,5% NaCl	6×10^7	1×10^8
+ 10% sacharozy	1×10^7	$2{,}5\times10^7$

Największa ilość cząsteczek *L* form, zdolnych do wytworzenia kolonii, otrzymano w bulionie węglowym z dodatkiem 0,01 M roztworu fosforanów przy pH 7,8. Przy zwiększonym ciśnieniu osmotycznym po dodaniu 1,5% NaCl albo 10% sacharozy stwierdzono częściowe zahamowanie namnażania. Ze względu na to, że formy *L* rosną w bulionie w postaci gronek, połączonych niekiedy niteczkami, po wytrząsaniu hodowli z perełkami otrzymano wyższe wyniki.

Postacie *L* namnażały się również po doomocznowym lub doowodniowym zakażeniu zarodków kurzych hodowlą płynną rozcieńczoną do 1000 razy.

Przy badaniu hodowli płynnej w mikroskopie kontrastowo-fazowym stwierdzono występowanie ciał dużych, czasami zwakuolizowanych, ciał pośrednich oraz znaczną ilość drobnych ciemnych ziaren.

W miarę przesiewania w bulionie z węglem hodowla *L* zmieniała swoje właściwości. Wyrażało się to stopniowym zanikiem wzrostu powierzchniowego a coraz częstszym występowaniem zmętnienia wraz z wytworzeniem osadu. Do badań serologicznych (Lorkiewicz i współpracownicy, 1958) bardziej nadawał się antygen otrzymany z po-

żywki płynnej niż ze stałej, ponieważ otrzymywano go w większych ilościach i to w postaci mniej lub bardziej jednorodnej zawiesiny.

Starano się wyjaśnić rolę węgla w bulionie. Prawdopodobnie węgiel neutralizuje działanie szkodliwych metabolitów wytwarzanych podczas namnażania postaci *L*. Jeśli usunięto węgiel z bulionu przed wsianiem form *L*, wówczas nie uzyskiwano namnożenia w pierwszych przesiewach na bulionie węglowym. Jednakże po kilkunastu przesiewach w podłożu płynnym zmieniał się nie tylko charakter wzrostu postaci *L*, ale również ich właściwości. Postacie te wsiane do bulionu odżywczego (bez węgla i surowicy) wytwarzały w ciągu tygodnia kożuszek. Drugi przesiew dawał słabsze namnożenie, a pasaż czwarty zwykle już nie dawał wzrostu. W preparatach zrobionych z 1-2 pasażu w bulionie stwierdzono przewagę ciał dużych zwakuolizowanych i stosunkowo małą ilość lub brak drobnych, ziarnistych elementów, silnie załamujących światło. Również na agarze odżywczym bez surowicy, po gęstym wsiewie postaci *L* z hodowli bulionowej z węglem, powstawały w ciągu kilku dni mikrokolonie *L*. Były one jednak mniejsze od kolonii *L* otrzymywanych na agarze węglowym lub surowiczym i przypominały raczej młode kolonie *L*, gdzie centrum nie wyróżnia się ciemniejszym, zielonkawobrunatnym zabarwieniem od zewnętrznej strony kryzy. Zazwyczaj już w drugim przesiewie na agarze zwykłym nie otrzymywano wzrostu.

DYSKUSJA

Powyższe obserwacje nad wzrostem form *L* na agarze odżywczym przypominają wyniki uzyskane przez Dienesa. Dienes jednak używał do hodowli płynnych kolonii typu *B*, podczas gdy autor zastosował hodowlę typu *A*. Przesiewy w bulionie z dodatkiem węgla adsorpcyjnego zmieniają wyraźnie własności postaci *L*. Zagadnienie różnic między postaciami *A* i *B* form *L* zaczyna się coraz bardziej komplikować. Jako cechy charakterystyczne dla form *L* typu *A* Dienes uważa:

a) większe wymagania wzrostowe (dodatek surowicy),
b) mniejsze kolonie (do 500μ),
c) zdolność ustalenia.

Kolonie typu *B* według Dienesa są większe (0,5-2 mm), namnażają się na podłożu bez surowicy oraz nie udaje się ich ustalić.

Dotychczas nie udało się przeprowadzić większej ilości przesiewów form *A* na bulionie lub agarze odżywczym. Jednakże autor wykonał kilka udanych prób hodowli na agarze lub bulionie. W bulionie namnożenie postaci *L* następowało jedynie w pierwszym i drugim pasażu. W dalszych przesiewach hodowla zanikała.

Różnice w wielkości kolonii nie są tak bardzo istotne. Autor stwierdził (nie opublikowane), że formy *L* typu *A* hodowane na agarze z dodatkiem węgla adsorpcyjnego wytwarzają kolonie większe od kolonii typu *B*.

Również trzecia różnica przestała być aktualna, gdy Dienes ustalił formy *L* typu *B* w hodowli płynnej.

LITERATURA

Abrams R. Y., 1955: A method for the cultivation of *L* forms in liquid media *J. Bact.*, **70**: 251.

Dienes L., 1953: Some new observations on *L* forms of bacteria. *J. Bact.*, **66**: 274.

Klieneberger E., 1936: Further studies on *Streptobacillus moniliformis* and its symbiont. *J. Path. Bact.*, **42**: 586.

Lorkiewicz Z., 1957: Growth of stabilized *L* forms of *Proteus vulgaris* without the addition of serum and penicillin. *Acta Microbiol. Polon.*, **6**: 3.

Lorkiewicz Z., Hulanicka E., Weinrauder H., 1958: Badania nad budową antygenową form *L 3A* i *3B Proteus vulgaris*. *Acta Microbiol Polon.*, **6**: 311.

Tulasne R., Vendrely R., Minck R., Muller L., 1950: Technique pour la culture des formes submicroscopiques (formes *L*) du *Proteus vulgaris* en milieu liquide. *C. r. Acad. Sci.* **230**: 152.

Tulasne R., 1950: Quelques données nouvelles sur la formation et les caractères de culture des formes *L du Proteus vulgaris*. *C. r. Soc. Biol.*, **144**: 1200.

Z. Lorkiewicz

FLUID MEDIUM FOR CULTIVATION OF *L* FORMS OF *PROTEUS MIRABILIS*

Summary

It was shown that *L* forms type *A* of *P. mirabilis* could be, by slow process, adapted to grow in nutrient broth without serum, when active charcoal was added to final concentration 0,5 per cent. After seven-days incubation the growth was quite well visible in the form of turbidity and surface pellicle.

The *L* forms transfered from this medium into plain broth grew only for two passages. Further transfers from plain broth to plain broth were ineffective.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 17-34

J. Jeljaszewicz

BADANIA NAD KOAGULAZAMI GRONKOWCOWYMI

I. METODY OZNACZANIA WOLNEJ I ZWIĄZANEJ KOAGULAZY*

Z Zakładu Mikrobiologii Akademii Medycznej w Poznaniu

Wpłynęło dnia 20 stycznia 1958 r.

Niektóre szczepy *Micrococcus pyogenes* wytwarzają co najmniej dwie koagulazy: „wolną" (Loeb, 1903) i „związaną" (Much, 1908). Ta ostatnia została bliżej zbadana dopiero przez Duthie (1952, 1954a, 1954b, 1955).

Koagulaza związana działa wprost na fibrynogen wrażliwych gatunków, powodując jego wytrącanie się na powierzchni komórek gronkowców i ich zlepianie się. Działanie jej występuje zarówno w roztworach oczyszczonego fibrynogenu, jak i plazmy. Koagulaza wolna natomiast wymaga istnienia w plazmie aktywatora (activator — Smith i Hale, 1944; „coagulase reacting factor" — Tager, 1948; „coagulase globulin" — Miale, 1949a, 1949b, 1952). Aktywator jest przypuszczalnie albo częścią protrombiny, albo substancją do niej podobną. Związana i wolna koagulaza są odmienne serologicznie, powodują bowiem wytwarzanie swoistych przeciwciał nie zobojętniających się krzyżowo (Duthie, 1954a).

Istnieje niewątpliwy związek między wytwarzaniem koagulazy przez gronkowce a potencjalną chorobotwórczością tych drobnoustrojów (Chapman, Berens, Peters i Curcio, 1934; Gross, 1931; Kemkes, 1928; Pijoan, 1935; Lücking, 1937; Walston, 1935; Fisher, 1936; Cruickshank, 1937; Fairbrother, 1940; Christie i Keogh, 1940; Spink i Vivino, 1942; Lomiński i Roberts, 1946; Christie i Parkin, 1946; Smith, Hale i Smith, 1947; Ekstedt, 1956; Ekstedt i Nungester, 1955).

* Praca zreferowana częściowo na posiedzeniu Oddziału Poznańskiego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów dnia 5. IV. 1957 r.

Zdecydowaną większość prac poświęcono wolnej koagulazie. Wielu autorów neguje nawet fakt istnienia dwóch koagulaz (np. Otto i Walter, 1955).

W istocie, mimo zasadniczych i cennych prac (Smith i Hale, 1944; Smith, Hale i Smith, 1947; Tager, 1948; Tager i Hales, 1947, 1948a, 1948b, 1948c; Tager i Lodge, 1951a, 1951b; Duthie, 1952; 1954a, 1954b, 1955; Duthie i Lorenz, 1950, 1952), bardzo niewiele wiadomo dotąd na temat koagulaz gronkowcowych.

Wobec braku standardowych metod oznaczania wyniki uzyskiwane przez różnych autorów są często nieporównywalne. Prawie zupełnie jest też nieznany mechanizm działania koagulaz in vivo.

W obecnych badaniach starano się przede wszystkim opracować i dobrać odpowiednie metody oznaczania obu koagulaz (głównie wolnej).

MATERIAŁY I METODY

Oznaczanie wolnej koagulazy: Metody oznaczania podzielono na 9 grup (szczegóły przedstawione są w tabelach I i II):

1. Metoda probówkowa z plazmą ludzką.
2. Metoda probówkowa z plazmą króliczą.
3. Metody probówkowe z innymi plazmami (wołową, baranią, świnki morskiej, psią i kurzą).
4. Bezpośrednia metoda probówkowa: Do 0,5 ml świeżej cytrynianowej plazmy króliczej nierozcieńczonej i rozcieńczonej bulionem w stosunku 1 : 5 dodawano 0,1 ml wydzieliny ropnej zawierającej gronkowce.
5. Metoda płytkowa: Do agaru zwykłego i agaru z dodatkiem 0,001% czerwieni obojętnej dodawano w temperaturze 45° — 15-20% cytrynianowej plazmy ludzkiej. Gotowe płytki przechowywano 1-30 dni. Szczepy koagulazododatnie po 24 godzinach inkubacji w 37° wytwarzały dookoła kolonii strefę zmętnienia o średnicy 1-10 mm.
6. Metoda probówkowa z liofilizowaną plazmą ludzką i króliczą: Świeżą plazmę cytrynianową w objętości 1 ml liofilizowano, zatapiano pod próżnią poniżej 100 μ słupa Hg i przechowywano 1-12 miesięcy w temperaturze pokojowej w ciemnym miejscu. Co miesiąc badano wartość jednej ampułki.
7. Metoda probówkowa z pełną krwią cytrynianową.
8. Metoda probówkowa z plazmą króliczą i fibrynogenem: Oznaczenie wykonano według Duthie (1954a).
9. Metoda probówkowa z fibrynogenem i surowicą jako źródłem aktywatora koagulazy: Oznaczenie wykonywano ściśle według Rammelkampa i współpracowników (1949).

ODCZYTYWANIE WYNIKÓW

Obserwacji dokonywano po 1, 3 i 6 godzinach, a wyniki odczytywano po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°. Za wynik dodatni uznawano występowanie skrzepu w czasie obserwacji. Szczepy ujemne badano co najmniej jeszcze raz tą samą metodą oraz z plazmą króliczą rozcieńczoną (1 : 5).

W każdej serii oznaczeń wykonywanych daną metodą przeprowadzano następujące oznaczenia kontrolne: ze szczepem silnie koagulazododatnim, ze szczepem koagulazoujemnym, z plazmą stosowaną do badania.

Ilościowe oznaczanie wolnej koagulazy: 48-godzinną hodowlę na bulionie mózgowo-sercowym z dodatkiem śladowej mieszaniny jonowej odwirowywano przy 3 500 obrotów/minutę. Oznaczenia wykonywano z płynem znad osadu albo natychmiast, albo też przechowywano go w stanie zamrożonym.

Do rozcieńczeń płynu 1 : 10 - 1 : 2560 w 2-procentowym roztworze albumin w soli lub 2-procentowym roztworze peptonu w soli rozlanych po 0,5 ml, dodawano po 0,5 ml standaryzowanej plazmy króliczej i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°. Najwyższe rozcieńczenie, w którym pojawiał się skrzep, przyjmowano jako miano wolnej koagulazy.

Standard koagulazy: Jako standard służył początkowo przesącz hodowli szczepu J-373 posiadający miano wolnej koagulazy 1 : 2560, przechowywany w temperaturze —20°. Następnie posługiwano się oczyszczonym preparatem wolnej koagulazy posiadającym miano 1 : 40 960, przechowywanym w stanie zliofilizowanym w temperaturze 4°.

Jednostka koagulazy: Za jednostkę koagulazy uważano najmniejszą jej ilość powodującą krzepnięcie standaryzowanej plazmy króliczej w ciągu 24 godzin w temperaturze 37°.

Standaryzacja plazmy: Stosowaną do oznaczeń plazmę cytrynianową badano w kierunku zawartości inhibitorów i aktywatora koagulazy. Plazmę uznawano za nadającą się do oznaczeń, gdy nie zawierała zupełnie inhibitorów, a miano aktywatora było wyższe niż 1 : 20. Ponadto standaryzowana plazma powinna była wykazywać zgodność oznaczenia ze standardem koagulazy.

Oznaczanie zawartości aktywatora wolnej koagulazy w plazmie: Do seryjnych rozcieńczeń badanej plazmy w objętości 0,2 ml dodawano 10 jednostek koagulazy w objętości 0,2 ml oraz 0,2 ml 5-procentowego roztworu fibrynogenu w soli fizjologicznej. Najwyższe rozcieńczenie, w którym pojawił się skrzep po 6 dniach inkubacji w temperaturze 37°, oznaczało miano aktywatora (T a g e r, 1948).

Oznaczanie inhibitorów wolnej koagulazy oparte było na metodzie opisanej przez R a m m e l k a m p a i współpracowników, 1949.

Szczepy *Micrococus pyogenes*: Przeanalizowano w pełni lub częściowo 500 szczepów pochodzących z przypadków chorobowych oraz od zdrowych nosicieli. Do otrzymywania koagulazy oczyszczonej posługiwano się szczepem *J-373* wyosobnionym z nosa zdrowego nosiciela (J e l j a s z e w i c z. 1958). W badaniach kontrolnych posługiwano się szczepami *J-457* oraz *Nr 3080* i *10534* otrzymanymi od dra D. Jachertsa i wytwarzającymi duże ilości wolnej koagulazy.

Podłoża: Bulion mózgowo-sercowy przygotowywano według przepisu Difco Laboratories (1953); do 1 litra gotowej pożywki dodawano 1 ml śladowej mieszaniny jonowej przesączonej przez filtr EK Seitza, przygotowanej według T a g e r a (1948). Bulion z albuminami przygotowywano przez dodanie wyjałowionych przez przesączenie przez filtr EK Seitza roztworu albumin ludzkich do końcowego stężenia 5%.

Oznaczanie związanej koagulazy: Metody oznaczania podzielono na 4 grupy:

1. Metoda szkiełkowa z plazmą ludzką. Wykonywano oznaczenia według metody opisanej przez Cadness-Graves i współpracowników (1943).

2. Metoda szkiełkowa z roztworem fibrynogenu: Oznaczenie wykonywano jak wyżej z tym, że zamiast plazmy stosowano 1-procentowy roztwór fibrynogenu w roztworze fizjologicznym NaCl.

3. Metoda probówkowa z roztworem fibrynogenu: Oznaczenie wykonywano według metody opisanej przez D u t h i e (1954a).

4. Metoda probówkowa z plazmą króliczą. Oznaczenie wykonywano jak wyżej z tym, że zamiast fibrynogenu używano plazmy króliczej rozcieńczonej (1 : 5).

WYNIKI

Stwierdzono, że znaczny wpływ na prawidłowe oznaczanie wolnej koagulazy ma metodyka badania. Przedstawione w tabeli I wyniki oznaczeń za pomocą różnych sposobów, często nieznacznie tylko różniących się między sobą, wykazują, że wiele czynników wpływa na poprawność oznaczeń, które nawet w najlepiej dobranych warunkach dalekie są od ideału. Badając porównawcze wyniki oznaczeń koagulazy 11 metodami, Williams i Harper (1946) stwierdzili, że za pomocą wielu metod można otrzymać fałszywie ujemne wyniki, przy czym zaledwie 3 metody dawały całkowitą zgodność.

Jest to zgodne z uzyskanymi przez nas wynikami oznaczeń, w których stwierdzono znaczną zależność wyników od drobnych zmian w zastosowanej metodyce.

Dla poprawności oznaczenia duże znaczenie ma odpowiednie rozcieńczenie plazmy. Rozcieńczenie jej przy pomocy bulionu dawało zawsze większą ilość wyników dodatnich.

Ilość wyników dodatnich zależy również od rodzaju podłoża, na jakim hodowano uprzednio badane bakterie. Przy hodowli bulionowej otrzymuje się większą ilość wyników dodatnich niż przy posługiwaniu się bakteriami z hodowli agarowej. Podobnie, jak wykazują to liczne badania (Davies, 1951; Duthie, 1952; 1954a; Duthie i Lorenz, 1952; Rammelkamp, Hezebicks i Dingle, 1950), stwierdzono, że dodatek surowicy lub albumin do podłoża działa pobudzająco na wytwarzanie koagulazy. Przy hodowli na bulionie z dodatkiem 5% albumin ludzkich zaczęło wytwarzać koagulazę 29 na 300 badanych szczepów, uprzednio na bulionie zwykłym nie produkujących jej. Ponadto na podłożu tym otrzymywano dużą zgodność wyników przy różnych rozcieńczeniach plazmy, czego nie obserwowano w pozostałych oznaczeniach.

Plazma królicza daje zdecydowanie lepsze wyniki niż ludzka. We wszystkich oznaczeniach uzyskiwano z nią wyższą ilość wyników dodatnich.

Jak było do przewidzenia na podstawie licznych badań poprzednich (np. Gerheim i Ferguson, 1949), plazma innych gatunków nie nadaje się do oznaczeń. Zaledwie jeden szczep okazał się słabo koagulazododatni wobec plazmy świnki morskiej, co zresztą jest zjawiskiem raczej wyjątkowym.

Metoda bezpośredniego oznaczania wolnej koagulazy, przez posiew badanego materiału wprost do odpowiedniej plazmy, okazała się mało czuła. Przebadano 50 próbek ropy zawierającej gronkowce. W metodzie bezpośredniej zaledwie 74% próbek spowodowało krzepnięcie plazmy,

Tabela I

Porównawcze wyniki oznaczeń wydzielania wolnej koagulazy przy zastosowaniu metody probówkowej z plazmą ludzką lub króliczą w różnych modyfikacjach
The comparative value of different methods of assay for staphylocoagulase (with human and rabbit plasma)

Rozcieńczenie plazmy Dilution of plasma	Czym rozcieńczono Diluted with	Ogólna objętość plazmy Total volume	Źródło koagulazy Source of coagulase	Ilość Amount	Plazma ludzka Koagulaza Human plasma Coagulase +	Plazma ludzka Koagulaza Human plasma Coagulase −	Plazma królicza Koagulaza Rabbit plasma Coagulase +	Plazma królicza Koagulaza Rabbit plasma Coagulase −
Nierozcieńczona Undiluted		0,5 ml	18-godzinna hodowla agarowa 18h agar culture	oczko loopful	232	68	247	53
1:2	0,85% NaCl	„	„	„	229	71	241	59
1:4	„	„	„	„	235	65	245	55
1:6	„	„	„	„	239	61	248	52
1:8	„	„	„	„	247	53	250	50
1:10	„	„	„	„	245	55	249	51
1:2	bulion	„	„	„	230	70	252	48
1:4	broth	„	„	„	248	52	255	45
1:6	„	„	„	„	251	49	255	45
1:8	„	„	„	„	257	43	257	43
1:10	„	„	„	„	255	45	255	45
Nierozcieńczona Undiluted			18-godzinna hodowla bulionowa 18h broth culture	0,1 ml	239	61	260	40
1:2	0,85% NaCl	„	„	„	243	57	259	41
1:4	„	„	„	„	243	57	261	39
1:6	„	„	„	„	250	50	263	37
1:8	„	„	„	„	253	47	262	38
1:10	„	„	„	„	257	43	261	39
1:2	bulion	„	„	„	249	51	261	39
1:4	broth	„	„	„	245	55	263	37
1:6	„	„	„	„	261	39	265	35
1:8	„	„	„	„	265	35	262	38
1:10	„	„	„	„	272	28	263	37
Nierozcieńczona Undiluted		„	18-godzinna hodowla na bulionie z albuminami 18h culture on broth with albumine	„	281	19	289	11
1:2	0,85% NaCl	„	„	„	283	17	288	12
1:4	„	„	„	„	282	18	291	9
1:6	„	„	„	„	281	19	290	10
1:8	„	„	„	„	280	20	290	10
1:10	„	„	„	„	279	21	290	10

Oznaczenie wykonywano w probówkach 0,7 × 60 mm. Inkubacja w łaźni wodnej, temperatura 37°. Odczytywanie wyniku po 24 godzinach, wstępne obserwacje po 1, 3 i 6 godzinach. W każdej serii oznaczeń kontrola plazmy za pomocą szczepu koagulazododatniego, koagulazoujemnego i stosowanego płynu do rozcieńczenia.

Tests were made in 0,7 × 60 mm tubes incubated in water-bath (37°) for 24 hours. Results recorded after 24 hours.

Tabela II

Wyniki oznaczeń wolnej koagulazy za pomocą innych metod
Determination of free staphylocoagulase by other methods

Rodzaj substratu Substrat	Inoculum	Ilość badanych szczepów koagulazo-dodatnich [1] Number of examined coagulase positive strains	Ilość szczepów powodujących koagulację plazmy po 24 godzinach Number of strains that coused the clotting of plasma after 24 hours
Plazma wołowa rozcieńczona 1 : 5 bulionem Plasma of a cow diluted 1 : 5 with broth	0,1 ml hodowli bulionowej 0,1 ml of broth culture	50	30
Plazma barania rozcieńczona 1 : 5 bulionem Plasma of a sheep diluted 1 : 5 with broth	„	50	17
Plazma świnki morskiej rozcieńczona 1 : 5 bulionem Plasma of guinea pig diluted 1 : 5 with broth	„	50	1 [2]
Plazma kurza rozcieńczona 1 : 5 bulionem Plasma of chicken diluted 1 : 5 with broth	„	50	0
Plazma psia rozcieńczona 1 : 5 bulionem Plasma of dog diluted 1 : 5 with broth	„	50	5
Plazma królicza rozcieńczona 1 : 5 bulionem Plasma of rabbit, diluted 1 : 5 with broth	0,1 ml ropy gronk. 0,1 ml of pus „	50 50	37 36
Plazma królicza nierozcieńczona Plasma of rabbit, undiluted			
Agar z 15-20% plazmy ludzkiej Agar + 15-20% of human plasma	oczko wzrostu z agaru loopfull of agar growth	50	47
Agar z plazmą ludzką + 0,001% czerwieni obojętnej Agar + human plasma + neutral red (0,001%)	„	50	48

[1] Szczepy koagulazododatnie — na podstawie oznaczenia przy zastosowaniu plazmy króliczej rozcieńczonej 1 : 5 za pomocą bulionu oraz incolum pochodzącym z 18-godzinnej hodowli bulionowej.

[2] Słabo dodatni — slightly positive.

Tabela II (ciąg dalszy)

Rodzaj substratu Substrat	Inoculum	Ilość badanych szczepów koagulazo-dodatnich Number of examined coagulase positive strains	Ilość szczepów powodujących koagulację plazmy po 24 godzinach Number of strains that coused the clotting of plasma after 24 hours
Plazma ludzka liofilizowana po 1 miesiącu przechowywania Human plasma, frozen-dried, after 1 month of storage	0,1 ml hodowli bulionowej 0,1 ml of broth culture	20	20
Plazma ludzka liofilizowana po 12 miesiącach przechowywania Human plasma, frozen-dried, after 12 months of storage	„	30	30
Plazma królicza liofilizowana po 1 miesiącu przechowywania Plasma of rabbit, frozen-dried, after 1 month of storage	„	20	20
Plazma królicza liofilizowana po 12 miesiącach przechowywania Plasma of rabbit, frozen-dried, after 12 months of storage	„	30	30
Pełna ludzka krew cytrynianowa Human blood with citrate	„	50	39
Plazma królicza z fibrynogenem [3] Plasma of rabbit + fibrinogen	„	50	50
Fibrynogen z aktywatorem koagulazy [4] Fibrinogen + coagulase activator	„	50	50

[3] Oznaczenie według Duthie (1954 a) — Test according to Duthie (1954 a).
[4] Oznaczenie według Rammelkampa i współpracowników (1949) — Test according to Rammelkamp *et al* (1949).

mimo że wyosobnione z nich później szczepy okazały się koagulazododatnie.

Dobre wyniki uzyskano przez zastosowanie agaru z dodatkiem 15-20% plazmy ludzkiej. Na jednej płytce można badać naraz około 15 szczepów. Wytwarzanie stref zmętnienia dookoła kolonii koagulazododatnich jest dobrze widoczne w świetle odbitym. Dodatek czerwieni obojętnej wzmaga widoczność stref zmętnienia. Metoda ta daje 96% zgodności z najlepszą metodą probówkową. Gotowe podłoże może być przechowane w chłodni przez tydzień. Stwierdzono też, że nawet plazmy zawierające średnie ilości inhibitorów koagulazy nadawały się do uży-

cia w metodzie płytkowej. Należy to prawdopodobnie tłumaczyć dużą ilością koagulazy, gromadzącą się dookoła kolonii.

Doskonałe wyniki uzyskano z plazmą ludzką i króliczą dobrze wysuszoną ze stanu zamrożenia. Plazmy te, przechowywane przez rok w temperaturze pokojowej, zachowały w pełni swoje własności. Czynnikiem decydującym jest tu stopień wysuszenia plazmy (pod warunkiem oczywiście takiego zamrożenia, aby fibrynogen nie został uszkodzony) oraz zamknięcie i przechowywanie pod próżnią w ciemnym miejscu. Przygotowana jednocześnie w ten sam sposób plazma, przechowywana jednak nie w zatopionych ampułkach, lecz w probówkach zamkniętych korkami gumowymi, już po dwóch miesiącach nie nadawała się do oznaczania koagulazy.

Zastosowanie do oznaczania koagulazy pełnej krwi cytrynianowej, polecane przez Chapmana (1944, 1945), nie okazało się celowe. Przeszło 20% koagulazododatnich szczepów nie powodowało krzepnięcia takiej krwi, a część z nich nie rozwijała się w ogóle. Natomiast używanie plazmy króliczej z fibrynogenem (Duthie, 1954a) oraz roztworu fibrynogenu z dodatkiem aktywatora (Rammelkamp i współpracownicy, 1950) dało doskonałe wyniki i całkowitą zgodność.

Obu tych metod, ze względu na kosztowność przyrządzania roztworów fibrynogenu *ex tempore*, nie można zastosować do badań rutynowych; nadają się one przede wszystkim do badań naukowych.

Doniesienia o występowaniu inhibitorów wolnej koagulazy oraz o jej własnościach antygenowych (Tager i Hales, 1948c; Duthie i Lorenz, 1952; Gross, 1931; Lominski i Roberts, 1946; Bekker, 1947, 1949; Boake, 1956; Rammelkamp, 1950) skłoniły nas do przebadania 120 próbek plazmy pochodzących od krwiodawców. Okazało się (tabela III), że zaledwie połowa próbek nadawała się w pełni do oznaczania. Na 120 próbek plazmy — 29 zawierało zbyt małe ilości aktywatora, a w 31 znaleziono inhibitory koagulazy. Kilka próbek szczególnie silnie hamowało działanie koagulazy, nie krzepnąc w żadnym rozcieńczeniu.

Ponieważ plazma ludzka jest najłatwiej dostępna z ośrodków krwiodawstwa, zbadano przydatność 20 próbek plazmy konserwowanej, stosowanej do celów przetaczania krwi (tabela IV).

Stwierdzono, że ponad połowa badanych próbek nie krzepła pod wpływem koagulazy wytwarzanej przez żywe bakterie. 3 próbki nie krzepły nawet po dodaniu do nich stężonych preparatów koagulazy. We wszystkich przypadkach krzepnięcie występowało później aniżeli w przypadku równoległego zastosowania plazmy króliczej.

Badając ilość wolnej koagulazy w przesączach 500 szczepów pochodzących z przypadków chorobowych i od zdrowych nosicieli stwier-

Tabela III

Przydatność różnych próbek plazmy pochodzących od zdrowych osobników do oznaczania wolnej koagulazy
Comparative value of different samples of human plasma for determination of staphylocoagulase

Ilość badanych próbek plazmy Number of samples tested	Z tego nie nadających się do oznaczeń ze względu na: Unsitable due to:		Nadających się do oznaczeń Suitable
	Brak dostatecznej ilości aktywatora Lack of activator	Występowanie inhibitorów Excess of inhibitor	
120	29	31	60

Uwaga: Oznaczanie wolnej koagulazy jak w tabeli I.
Coagulase determined as in Table I.

Tabela IV

Przydatność plazmy konserwowanej do oznaczania wolnej koagulazy
Determination of coagulase with stored plasma

Ilość badanych próbek plazmy Number of samples tested	Koagulacja — Clotting*	
	+	−
20	9	11

* Oznaczenie wolnej koagulazy jak w tabeli I.
Coagulase determined as in Table I.

Tabela V

Miano wolnej koagulazy w przesączach 500 szczepów *Micrococcus pyogenes* pochodzących z różnych źródeł
Titre of free coagulase in culture-filtrates of 500 strains of *M. pyogenes* isolated from different sources

Ilość szczepów Number of strains	Miano wolnej koagulazy — Titre*
101	Koagulacja tylko z żywymi hodowlami Clotting only in presence of living bacteria
317	1 . 10—1 : 320
62	1 : 300—1 : 1280
16	ponad 1 : 1280 over 1 . 1280

* Oznaczenie według Tagera i Hales (1947) z zastosowaniem plazmy króliczej nierozcieńczonej zamiast plazmy ludzkiej.
Determination according to Tager and Hales (1947) with undiluted rabbit plasma.

dzono, że wysokość miana nie zależy od pochodzenia szczepu. Duża część szczepów, wyosobnionych z przypadków chorobowych w czystej hodowli, wykazywała bardzo niskie miana. Wyniki tych oznaczeń przedstawiono w tabeli V.

Tabela VI

Oznaczanie koagulazy związanej za pomocą różnych metod
Determination of bound coagulase by different methods

Metoda oznaczania Test	Ilość szczepów Number of strains	
	badanych tested	powodujących skłaczanie that coused clotting
Szkiełkowa z plazmą ludzką Slide test with human plasma	100	72
Szkiełkowa z roztworem fibrynogenu Slide test with fibrinogen	100	70
Probówkowa z plazmą króliczą Tube test with rabbit plasma	100	73
Probówkowa z roztworem fibrynogenu Tube test with fibrinogen	100	72

Tabela VII

Ilość szczepów wytwarzających wolną i związaną koagulazę wśród 500 badanych szczepów *M. pyogenes*
Number of strains producing free and bound coagulase among 500 examined strains of *M. pyogenes*

Związana koagulaza Bound coagulase	Wolna koagulaza Free coagulase		
	+	—	razem total
+	367	—	367
—	43	90	133
razem total	410	90	500

Wśród 16 szczepów wykazujących najwyższe miana aż 9 (w tym 1 z mianem 1 : 5120) pochodziło z jamy nosowej zdrowych nosicieli. Tylko około 20 szczepów w postaci żywych bakterii powodowało krzepnięcie plazmy; ich przesącze nie działały na plazmę. Tager i Hales (1947) stwierdzili, że blisko połowa (47,5%) badanych przez nich szcze-

pów wytwarza koagulazę czynną tylko w zawiesinie żywych komórek.

Przedstawione w tabeli VI wyniki oznaczeń koagulazy związanej, wykonane za pomocą 4 metod, wykazują dużą zgodność. Rzecz jasna, że metodą z wyboru jest oznaczanie w probówce, co pozwala na ilościowe odczytanie wyników; metoda szkiełkowa jest jednak także cenna.

W badaniach występowania koagulazy wolnej i związanej stwierdzono częstsze pojawianie się pierwszej. Na 500 szczepów — 410 wytwarzało wolną koagulazę, a 367 związaną. 41 szczepów wydzielających wolną koagulazę nie wytwarzało związanej; natomiast 2 szczepy dodatnie w odczynie na wolną koagulazę dawały słabo dodatni (wątpliwy) odczyn w metodzie probówkowej na oznaczanie związanej koagulazy (tabela VII).

DYSKUSJA

Oznaczanie wolnej koagulazy wymaga doboru odpowiedniej metody zapewniającej optimum warunków koniecznych do zadziałania na plazmę. Nie można tego dokonać na podstawie teoretycznej znajomości mechanizmu działania koagulazy, ponieważ bardzo mało dotąd wiadomo o koagulazach pod każdym prawie względem. Jedynie więc przebadanie dużej ilości metod oznaczania pozwoli na wybór najodpowiedniejszej.

W badaniach tych stwierdzono, że:

1. Plazma królicza daje największą ilość dodatnich wyników. Nie zawiera przy tym zwykle inhibitorów, a posiada często dużo większą zawartość aktywatora koagulazy niż plazma ludzka. Z tych względów plazma królicza najbardziej nadaje się do oznaczania wolnej koagulazy.

2. Plazma ludzka również może być użyta do oznaczania wolnej koagulazy, jednak uprzednio należy zbadać zawartość w niej aktywatora i inhibitorów. Stwierdzono bowiem, że około połowa próbek plazmy ludzkiej, pochodzącej od zdrowych osobników, nie nadaje się do oznaczeń, zawierając inhibitory, czasami całkowicie hamujące działanie koagulazy lub też odznaczające się zbyt małą ilością aktywatora.

Najlepiej stosować plazmę pochodzącą od jednego dawcy. Można ją przechowywać przez okres co najmniej 3 miesięcy w temperaturze —20° lub w stanie zliofilizowanym pod próżnią. Stwierdzono ponadto, że zlewki kilkunastu próbek plazmy, indywidualnie doskonale nadających się do oznaczeń, o wiele słabiej ulegają działaniu koagulazy. Mechanizm tego zjawiska nie jest jasny. Być może, że powodowane jest to przez nieznaczne uszkodzenia fibrynogenu lub aktywatora w czasie wielokrotnego przelewania.

3. Standaryzowana plazma królicza lub ludzka, nierozcieńczona lub rozcieńczona w stosunku 1 : 2-1 : 10 za pomocą bulionu przy zasto-

sowaniu 0,1 ml 18-godzinnej hodowli bulionowej gronkowca, daje dużą ilość wyników dodatnich przy oznaczaniu wolnej koagulazy. Jeszcze lepsze wyniki otrzymuje się przy użyciu 0,1 ml hodowli bulionowej z dodatkiem 5% albumin lub 10% surowicy ludzkiej. Ta ostatnia metoda pozwala wykryć praktycznie 100% przypadków występowania wolnej koagulazy.

4. Plazma stosowana do oznaczeń wolnej koagulazy nie powinna być konserwowana przez dodawanie środków stosowanych do konserwacji krwi. Stwierdzono bowiem, że plazma taka nie posiada równorzędnej wartości z niezawierającą środków konserwujących. Można natomiast wyrazić wątpliwość co do słuszności obserwacji Linella i Corilla (1951), według których plazma z dodatkiem mertiolatu nie krzepnie pod wpływem wolnej koagulazy. Przesącz hodowli szczepu *J-373*, wytwarzającego duże ilości wolnej koagulazy, nie tracił swej aktywności pod wpływem dodatku mertiolatu (British Drug Houses) w końcowym stężeniu 1 : 2000. Zjawisko to wymaga jeszcze szczegółowego zbadania.

5. Plazma innych gatunków, poza króliczą i ludzką, nie nadaje się do oznaczeń wolnej koagulazy (mimo, że plazma mysia wykazuje dużą wrażliwość na jej działanie).

Wartość innych metod oznaczania koagulazy jest bardzo różna.

Bezpośredni posiew badanego materiału do plazmy jest metodą o wątpliwej wartości. W naszych badaniach około 25% koagulazododatnich szczepów uchodziło uwadze przy zastosowaniu tej metody. Natomiast praktycznie dość cenną metodą jest zastosowanie podłoża agarowego z dodatkiem 15-20% plazmy ludzkiej. Uzyskano tu dużą zgodność wyników z najlepszymi metodami. Podłoże może być przechowywane dłużej niż sama plazma. Strefy zmętnienia wokół kolonii koagulazododatnich są dobrze widoczne. Ponadto, zgodnie z obserwacją Lacka (1956), po dalszej 24-godzinnej inkubacji okazało się możliwe oznaczenie wydzielania fibrynolizyny przez szczepy koagulazododatnie, dzięki rozpuszczaniu przez nią wytrąconego dookoła kolonii włóknika. Zastosowane przez autora podłoże agarowe z dodatkiem plazmy, substancji hamujących wzrost innych drobnoustrojów oraz soli sodowej kwasu fenolftaleino-fosforowego, pozwala na oznaczenie na tej samej płytce koagulazy wolnej i związanej (przez wykonanie oznaczenia szkiełkowego), fibrynolizyny, fosfatazy i barwnika, który na tym podłożu jest wytwarzany bardzo intensywnie.

Idealnym rozwiązaniem przechowywania plazmy dla celów oznaczania wolnej koagulazy jest liofilizacja. Odpowiednio dobrana plazma królicza lub ludzka gwałtownie zamrożona, następnie liofilizowana do zawartości wilgoci poniżej 1%, zatopiona pod próżnią poniżej 100 mikronów i przechowywana w ciemnym pomieszczeniu w temperaturze poko-

jowej lub chłodni — jeszcze co najmniej po roku nadaje się idealnie do wykonywania wszelkich oznaczeń koagulazy.

Pełna natomiast krew cytrynianowa, zarówno ludzka jak i królicza, nie nadaje się do oznaczania wolnej koagulazy. 20% zbadanych szczepów koagulazododatnich nie powodowało krzepnięcia takiej krwi.

Bardzo dobre wyniki, podobnie jak z plazmą króliczą i plazmami liofilizowanymi, uzyskano przy zastosowaniu plazmy króliczej z dodatkiem fibrynogenu lub roztworu fibrynogenu z aktywatorem koagulazy. Ta ostatnia metoda jest ponadto najodpowiedniejsza dla wszystkich oznaczeń ilościowych itp., poszczególne składniki substratu występują bowiem w znanych ilościach.

Badania nad zdolnością wytwarzania koagulazy wolnej i związanej przez 500 badanych szczepów gronkowców, pochodzących z różnych źródeł, dały na ogół wyniki zgodne z rezultatami innych badaczy. U 47,5% szczepów badanych przez Tagera i Hales (1947) stwierdzono występowanie wolnej koagulazy tylko w hodowli żywych bakterii. Williams i Harper (1946) stwierdzili, że 12% szczepów koagulazododatnich daje ujemny wynik w metodzie szkiełkowej. Cadness-Graves, Williams, Harper i Miles (1943) znaleźli pewną zależność występowania koagulazy wolnej i związanej, jednakże wśród szczepów wyosobnionych z przypadków chorobowych 2 wydzielające koagulazę wolną nie wytwarzały koagulazy związanej. Podobnie wśród szczepów pochodzących od nosicieli 48 nie wytwarzało koagulazy związanej, wytwarzając jednocześnie koagulazę wolną. Brak podstaw, by uznać szczepy występujące w nosie i gardle zdrowych osobników za potencjonalnie niechorobotwórcze. Na podstawie bardzo licznych prac, opisujących zakażenie szpitalne pochodzące od nosicieli, uzasadniony wydaje się wniosek wręcz przeciwny. Z tych powodów nie można polecić wykonywania jedynie testu szkiełkowego do oznaczania wolnej koagulazy. Zgodnie z autorami powyższej metody (Cadness-Graves i współpracownicy), należy zalecać ewentualnie wykonanie testu szkiełkowego, a w wypadkach ujemnego lub wątpliwego wyniku, wykonanie oznaczenia wolnej koagulazy za pomocą jednej z opisanych tu metod. Należy przy tym zwracać uwagę, co słusznie podkreśla wielu autorów, aby czas obserwacji skłaczania w metodzie szkiełkowej przy wyniku dodatnim nie był dłuższy niż 5-15 sekund. Powyższy sposób oznaczania koagulazy dla celów rutynowych, polecany przez wielu badaczy, znalazł całkowite potwierdzenie w naszych badaniach. Także wyniki uzyskane ostatnio w kraju przez Lachowicza i Romanowskiego (1957) są w pełni z tym zgodne.

Dla celów rutynowych można też polecać metodę płytkową. W celu dokładnego oznaczania należy stosować jedną z metod ilościowych, oczywiście odrębną dla każdej koagulazy.

Stwierdzono, że wydzielanie wolnej koagulazy nie jest ściśle związane z innymi cechami charakteryzującymi chorobotwórczość gronkowców. Na przykład wytwarzający dużo koagulazy szczep *J-373* wykazywał słabe własności hemolityczne i barwikotwórcze.

Autor jest serdecznie wdzięczny panu prof. drowi J. Adamskiemu za cenne rady i pomoc, panu drowi R. Kotelbie za próbki plazmy i krwi ludzkiej, liofilizację i cenne dyskusje, panu doc. drowi K. Zakrzewskiemu za udostępnienie liofilizowanych albumin, panu drowi D. Jechertsowi z Hygiene-Institut, Universität Tübingen w NRF za przesłanie swoich szczepów oraz panu S. Jaraczewskiemu za pomoc w uzyskaniu fibrynogenu.

LITERATURA

Bekker, J. H., 1947: Studies on staphylococci: II. Antistaphylocoagulase in human serum. *Ant. van Leeuvenhoek J. M.*, **13**: 128.

Bekker, J. H., 1949: Studies on staphylococci: III. Staphyloccagulase, an antigen. *Ant. van Leeuvenhoeck J. M.*, **15**: 37.

Boake, W. C., 1956: Antistaphylocoagulase in experimental staphylococcal infections. *J. Immunol.* **76**: 89.

Cadness-Graves, B., Williams, R. E. O., Harper, G. J., Miles, A. A., 1943: Slide test for coagulase-positive staphylococci. *Lancet.* **2**: 736.

Chapman, G. H., Berens, C., Peters, A., Curcio, L., 1934: Coagulase and hemolysin tests as measures of the pathogenicity of staphylococci. *J. Bact.*, **28**: 34.

Chapman, G. H., 1944: The comparative value of human plasma and human whole blood for testing the coagulating power of staphylococci. *J. Bact.* **47**: 211.

Chapman, G. H., 1945: The value of concentrated human whole blood and agar cultures for testing the coagulation power of staphylococci. *J. Bact.* **50**: 234.

Christie, R., Keogh, E. V., 1940: Physiological and serological characteristics of staphylococci of human origin. *J. Path. Bact.* **51**: 189.

Christie, R., Parkin, B. J., 1946: Criteria of pathogenicity of staphylococci. *Australian J. Exper. Biol. Med. Sci.* **24**: 73.

Cruickshank, R., 1937: Staphylocoagulase. *J. Path. Bact.* **45**: 295.

Difco Manual, 1953: 9th Edition; Detroit, Michigan, USA.

Davies, G. E., 1951: Factors influencing the in vitro production of staphylococcal coagulase. *J. Gen. Microbiol.* **5**: 687.

Duthie, E. S., Lorenz, L. L., 1950: Staphylococcal coagulase: The nature of plasma activator in the clotting process. *Nature*, **165**: 729.

Duthie, E. S., 1952: Variation in the antigenic composition of staphylococcal coagulase. *J. Gen. Microbiol.* **7**: 320.

Duthie, E. S., Lorenz, L. L., 1952: Staphylococcal coagulase: Mode of action and antigenicity. *J. gen. Microbiol.*, **6**: 95.

Duthie, E. S., 1954a: Evidence for two forms of staphylococcal coagulase. *J. gen. Microbiol.*, **10**: 427.

Duthie, E. S., 1954b: The production of free staphylococcal coagulase. *J. gen. Microbiol.*, **10**: 437.

Duthie, E. S., 1955: The action of fibrinogen on certain pathogenic cocci. *J. gen. Microbiol.*, **13**: 383

Ekstedt, R. D., Nungester, W. J., 1955: Coagulase in reversing antibacterial activity of normal human serum on *Micrococcus pyogenes*. *Proc. Soc. Exp Biol. Med.*, **89**: 90.

Ekstedt, R. D., 1956: Further studies on antibacterial activity of human serum on *M. pyogenes* and its inhibition by coagulase. *J. Bact.*, **72**: 157.

Fairbrother, R. W., 1940: Coagulase production as an criterion for the classification of staphylococci. *J. Path. Bact.*, **50**: 83.

Fisher, A. M., 1936: Plasma coagulating properties of staphylococci. *Bull. J. Hopkins Hosp.*, **59**: 393.

Gerheim, J. B., Ferguson, J. H., 1949: Staphylocoagulation in plasmas of various animal species. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **71**: 258.

Gross, H., 1931: Der Plasmagerinnungsstoff der Staphylokokken. *Zentr. Bakter. I. O.*, **122**: 354.

Gross, H., 1932: Die Kulturfiltratstoffe der Staphylokokken und deren Beziehungen zueinander. *Ztschr. Immunitätsfchng.*, **73**: 14.

Hale, J. H., Smith, W., 1945: The influence of coagulase on phagocytosis of staphylococci. *Brit. J. Exp. Path.*, **26**: 209.

Jeljaszewicz, J., 1958: Badania nad koagulazami gronkowcowymi: II. Otrzymywanie oczyszczonych preparatów wolnej koagulazy: *Med. Dośw. Mikrobiol.*, w druku.

Kemkes, B., 1928: Plasmakoagulase und Pathogenität der Staphylokokken: *Zentr. Bakter. I. O.*, **109**: 11.

Lachowicz, T., Romanowski, T., 1957: Ocena różnych kryteriów chorobotwórczości gronkowców wyosobnionych z przypadków nosicielstwa w badaniach *in vitro*. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, **9**: 339.

Lack, C. H., 1956: Biclogical characteristic of staphylococci recovered from pathologic materials. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **65**: 103.

Linsell, W. D., Gorill, R. H., 1951: The effect of heat and sodium ethylmercurithiosalicylate on staphylococcus coagulase test. *J. Clin. Path.* **4**: 73.

Loeb, L., 1903: The influence of certain bacteria on the coagulation of blood. *J. Med. Res.*, **10**: 407.

Lominski, I., Roberts, G. B. S., 1946: A substance in human serum inhibiting staphylocoagulase. *J. Path. Bact.*, **58**: 187.

Lücking, B., 1937: Über die Methoden zur Bestimmung der Pathogenität der Staphylokokken unter besonderer Berücksichtigung der Blutplasmakoagulation, Bonn, S. 32.

Miale, J. B., 1949a: The role of staphylocoagulase in blood coagulation: I. The reaction of staphylocoagulase with coagulase-globulin (CG) to form coagulase--thrombin (CT). *Blood*, **4**: 1039.

Miale, J. B., 1949b: The role of staphylocoagulase in blood coagulation: II. Coagulation in the absence of calcium, and in the presence of fluorides, heparin and azo dyes. *Blood*, **4**: 1317.

Miale, J. B., 1952: The role of coagulase-globulin in blood coagulation and its thromboplastic action. *Amer. J. Clin. Path.*, **22**: 218.

Much, H., 1908: Über eine Vorstuffe des Fibrinfermentes in Kulturen von *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Ztschr.*, **14**: 601.

Otte, H. J., Walter, O., 1955: Zum Mechanismus der staphylogenen Plasmakoagulation: *Zentr. Bakter. I. O.*, **164**: 601.

Pijoan, M., 1935: A study of the blood-coagulating substance by staphylococci and its relation to diseases. *Canad. Med. Ass. J.* **32**: 476

Rammelkamp, C. H., Badger, G. F., Dingle, J. H., Feller, A. E., Hodges, R. G., 1949: A quantitative method for measuring staphylococcal anticoagulase, *Proc Soc. Exp. Biol. Med.*, **72**: 210.

Rammelkamp, C. H., Hezebicks, M. M., Dingle, J. H., 1950: Specific coagulases of *Staphylococcus aureus*. *J. Exp. Med.*, **91**: 295.

Rammelkamp, C. H., 1950: Antigenicity of cell-free staphylococcal coagulase. *J. infect. Dic.*, **86**: 159.

Smith, W., Hale, J. H., 1944: The nature and mode of action of staphylococcal coagulase. *Brit. J. Exp. Path.*, **25**: 101.

Smith, W., Hale, J. H., Smith, M. M., 1947: The role of coagulase in staphylococcal infection. *Brit. J. Exp. Path.*, **28**: 57.

Spink, W. W., Vivino, J. J., 1942: The coagulase test for staphylococci and its correlation with the resistance of the organism to the bactericidal action of human blood. *J. Clin. Invest.*, **21**: 353.

Tager, M., Hales, H. B., 1947: Quantitative coagulase and toxin production by staphylococci in relation to the clinical source of organism. *Yale J. Biol. Med.*, **20**: 41.

Tager, M., 1948: Studies on the coagulase-reacting factor: I. The reactions of staphylocoagulase with the components of human plasma. *Yale J. Biol. Med*, **20**: 369.

Tager, M., Hales, H. B., 1948a: Studies on the coagulase — reacting factor: II. Properties of CRF and relation to blood clotting components. *J. Immunol.*, **60**: 1.

Tager, M., Hales, H. B., 1948b: Differences in the resistance of human plasma to staphylocoagulase. *Yale J. Biol. Med.*, **21**: 91.

Tager, M., Hales, H. B., 1948c: The experimental production of antibodies to staphylocoagulase. *J. Immunol.*, **60**: 475.

Tager, M., Lodge, A. L., 1951a: Influence of physiological blood clotting process on coagulase factor and on prothrombin. *J. Exp. Med.*, **94**: 73.

Tager, M., Lodge, A. L., 1951b: Changes in properties of CRF of plasma after separation from prothrombin by Seitz filtration. *J. Immunol.* **67**: 63.

Walston, H. D., 1935: The clotting of plasma through staphylococci and their products. *J. Hyg.*, **35**: 549.

Williams, R. E. O., Harper, G. J., 1946: Determination of coagulase and alpha-hemolysin production by staphylococci. *Brit. J. Exp. Path.*, **27**: 72.

J. Jeljaszewicz

SOME EXPERIMENTS IN STAPHYLOCOAGULASE

I. METHODS OF DETERMINATION OF FREE AND BOUND COAGULASE

Summary

The value of 45 different modifications of various methods of assaying free staphylocoagulase was examined. The usefulness of 4 methods of determination of bound coagulase was also tested (Tables I-VI).

The best results were obtained with rabbit plasma (diluted or undiluted). The human plasma very often contains coagulase-inhibitors. Some specimens of human plasma were unsuitable due to the lack of specific coagulase activator.

Only half of examined samples of human plasma gave results comparable to these obtained with rabbit's plasma. Plasma of other origin (beef, guinea pig, dog, sheep, han) should not be used for determination of staphylocoagulase.

Plasma samples for the test may be stored in freeze-dried state.

The fresh citrated blood or blood conserved is unsuitable.

The number of positive results was the greatest with rabbit's plasma enriched with fibrinogen solution or with mixture of fibrinogen and coagulase activator solution. These substrats are yet to complicated for routine tests.

Staphylococci tested for the presence of free coagulase should be harvested from broth cultures.

Direct inoculation of pathological material (e. g. pus) into test-plasma did not give positive results. For some strains (29 among 300 examined) enrichment of the broth with 5% of human blood albumin was needed.

For routine use the plate-streake method could be recommended. It was almost as selective as tube-test and more convenient in mass screening of isolated strains.

No correlation was found between the production of coagulase and the source of isolation of 500 examined strains of *M. pyogenes v. aureus*. The majority of strains producing great amount of coagulase were isolated from naso-pharyngeal cavity of healthy persons.

In about 20% of positive cases the clotting of plasma was observed only in the presence of growing bacteria.

Among 500 strains tested — 410 produced free and 367 bound coagulase (Table VII).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 35-44

A. Luchter

BADANIA NAD PRZYDATNOŚCIĄ METOD MIKROBIOLOGICZNYCH DLA POSZUKIWANIA ROPY NAFTOWEJ W REJONIE INOWROCŁAWIA

Z Instytutu Naftowego w Krakowie

Wpłynęło dnia 1 lutego 1958 r.

Na terenie środkowej Polski prowadzone są kompleksowe badania geochemiczne, wykonywane w ramach prac poszukiwawczych ropy naftowej i gazu ziemnego.

W rejonie Inowrocławia w r. 1956 przeprowadzono również badania mikrobiologiczne, których celem było stwierdzenie występowania mikroflory węglowodorowej, jako wskaźnika obecności węglowodorów.

Teren powyższych badań obejmował 55 stanowisk badawczych (od 11-1 do 14-59) położonych nad południową i północną częścią wysadu solnego (O l e w i c z, 1958). Próbki gleby pobrano z głębokości 2 mm do sterylnych naczyń i przywieziono do laboratorium, gdzie założono hodowle bakterii węglowodorowych.

METODYKA BADAŃ

Otwory w glebie wiercono do danej głębokości, a następnie pobierano glebę sondą zakończoną sterylną nasadką. Unikano przy tym pobierania urobku, który mógł w czasie wiercenia nagromadzić się na dnie otworu. Nigdy nie pobierano próbek z wierzchniej, uprawianej warstwy gleby. Próbki gleby przewożono do laboratorium chroniąc je przed wysoką temperaturą i dostępem światła. Najodpowiedniejsza jest temperatura 2-6°. Zwracano również uwagę, by czas między pobraniem próbki a jej wysianiem był zawsze jednakowy dla danego terenu. Najobfitszą mikroflorę otrzymywano po wysianiu próbki natychmiast po pobraniu lub nie później niż po 24 godzinach.

Wskazane jest uzyskanie tzw. średniej próbki z danego stanowiska badawczego. W tym celu wierci się kilka otworów w pobliżu wyznaczonego stanowiska badawczego i pobiera się próbki gleby. Następnie z każdej próbki odważa się stałe jej ilości, miesza się je w sterylnych naczyniach i otrzymuje średnią próbkę gleby, najbardziej reprezentacyjną dla danego stanowiska. W obecnych bada-

niach wiercono tylko jeden otwór w danym stanowisku badawczym, pobierano próbkę gleby w ilości około 1 kg, dokładnie mieszano i przygotowywano rozcieńczenia, w celu wysiania ich na płytki z pożywką.

Badania przeprowadzono na płytkach żelowych nasyconych pożywką mineralną bezwęglową o następującym składzie: KH_2PO_4 — 5,0 g, K_2HPO_4 — 5,0 g, $MgSO_4$ — 2,0 g, KNO_3 — 10,0 g, NaCl — 10,0 g, H_2O — 1000 ml.

Z każdej próbki gleby, po dokładnym jej wymieszaniu, przygotowywano rozcieńczenia 1 : 10 i wstrząsano przez 15 minut. Następnie wysiewano po 1 ml zawiesiny na płytki żelowe. Płytki umieszczano w atmosferze mieszaniny powietrza z propanem, z metanem i w atmosferze samego powietrza. Mieszankę powietrza z węglowodorem sporządzano w ten sposób, że 1/3 część propanu lub metanu mieszano z 2/3 częściami powietrza. Hodowlę kontrolną w atmosferze samego powietrza prowadzono w celu sprawdzenia, czy drobnoustroje te mogą czerpać węgiel z CO_2 powietrza. Każdą hodowlę prowadzono w dwóch powtórzeniach (ze względów technicznych nie można było stosować większej ilości powtórzeń). Obserwacje przeprowadzano w ciągu 30 dni. Po uzyskaniu wzrostu bakterii przeszczepiano je ponownie na płytki żelowe i umieszczano w odpowiedniej mieszaninie gazów dla sprawdzenia, czy drobnoustroje te są nadal zdolne do korzystania z węglowodorów jako jedynego źródła węgla. Przy wysiewie zawiesiny gleby na płytki żelowe mogło się zdarzyć, że bakterie wykorzystywały jako źródło węgla związki organiczne zawarte w glebie.

Przeprowadzono również obserwacje makroskopowe kolonii bakterii oraz obserwacje mikroskopowe wyodrębnionych szczepów bakterii.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Po zestawieniu wyników badań okazało się, że z wysianych 55 próbek gleby z terenu Inowrocławia rozwinęło się 18 hodowli bakterii propanowych i 12 hodowli bakterii metanowych. Okres rozwoju bakterii wynosił 20-30 dni. Z niektórych stanowisk uzyskano wyniki pozytywne na obydwu płytkach, w innych na jednej płytce.

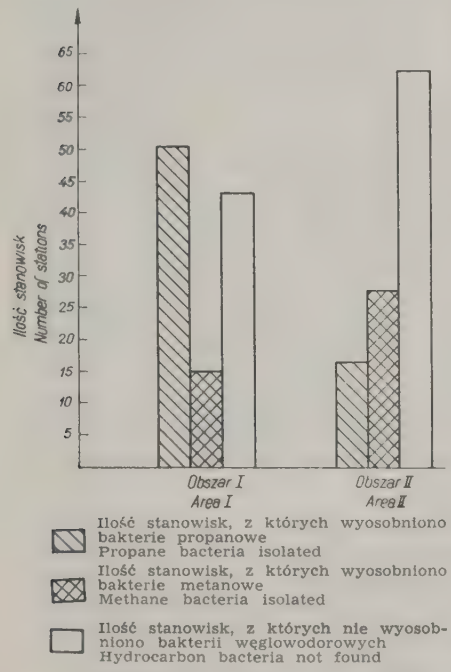
Po ponownym przeszczepieniu otrzymano wzrost wszystkich poprzednio wyodrębnionych bakterii. Świadczy to o uzyskaniu już w pierwszej hodowli właściwych bakterii węglowodorowych. Charakterystyczną cechą jest skrócenie okresu rozwoju bakterii po przeszczepieniu. Podczas gdy po pierwszym wysiewie okres rozwoju wahał się w granicach 20-30 dni, to po przeszczepieniu nie przekraczał 10 dni.

Po naniesieniu wyników na plan Inowrocławia (rys. 1) można wyodrębnić dwa obszary: obszar I obejmujący stanowiska badawcze od 11-1 do 13-23, oraz obszar II — od 13-24 do 14-59.

Obszar I obejmuje 26 stanowisk badawczych. Na tym obszarze otrzymano 13 hodowli bakterii propanowych, a tylko 4 hodowle bakterii metanowych. Charakterystyczne jest to, że dwa stanowiska, a mianowicie 11-6 i 12-21 są wspólne dla bakterii propanowych i metanowych. Ujemne wyniki uzyskano w 11 stanowiskach. Na obszarze tym uzyskano więc hodowle bakterii propanowych z 50% stanowisk badawczych.

Obszar II obejmuje 29 stanowisk badawczych, jednak tylko w 5

punktach stwierdzono występowanie bakterii propanowych. Stanowi to 17% ogólnej liczby stanowisk. Więcej, bo 8 stanowisk wykazywało wzrost bakterii metanowych. Również i w tym obszarze dwa stanowiska badawcze (13-33, 13-38) były wspólne dla bakterii propanowych i metanowych.



Rys. 2. Występowanie bakterii węglowodorowych w rejonie Inowrocławia
Fig. 2. Distribution of hydrocarbon bacteria in Inowrocław

Przy porównywaniu występowania bakterii węglowodorowych na obydwóch obszarach zaznacza się większa ilość stanowisk propanowych na pierwszym obszarze (rys. 2).

Przeprowadzając ocenę roponośności terenu na podstawie występowania bakterii węglowodorowych należy wziąć pod uwagę przede wszystkim bakterie propanowe, gdyż występowanie propanu przypuszczalnie związane jest wyłącznie ze złożami węglowodorów naftowych. Nie można zaś opierać się tylko na występowaniu bakterii metanowych, gdyż metan może powstać również w fermentacji błonnika oraz innych procesach fermentacyjnych. Mogilewski (1940, 1947) zaleca przy ocenie roponośności terenu, opierającej się na występowaniu bakterii metanowych, przeprowadzić dodatkowo hodowle bakterii błonnikowych, wywołujących fermentację, w wyniku której powstaje metan. Brak bakterii błonnikowych w badanej próbce gleby przy równoczesnym występowaniu bakterii metanowych ma według niego świadczyć, że metan w tym wypadku pochodzi z głębszych warstw.

W czasie przeprowadzania mikrobiologicznych badań na terenie Inowrocławia ocenę roponośności terenu przeprowadzono wyłącznie na podstawie występowania bakterii propanowych.

Obserwując makroskopowy wygląd kolonii bakterii propanowych zauważono, że przeważają kolonie zabarwione — o odcieniu żółtym, od kremowego przez jasnożółty, ciemnożółty, zielonożółty, łososiowy do

rdzawego. Kolonie przeważnie silnie wrastają w podłoże, nieliczne tylko rozlewają się na jego powierzchni. Niektóre mają powierzchnię gładką, matową, inne błyszczącą. Wśród drobnoustrojów rosnących w obecności mieszanki powietrza z propanem przeważają formy cylindryczne, krótsze lub dłuższe, układające się w stosunku do siebie pod różnym kątem, w kształcie litery V (rys. 3).

WNIOSKI

Na podstawie analizy mikrobiologicznej można przypuszczać, że obszar I (stanowiska od 11-1 do 13-23) odznaczający się występowaniem stanowiska propanowych, stanowiących 50% ogólnej ilości badanych stanowisk, może być związany z występowaniem złóż węglowodorowych. Na obszarze II występują wprawdzie dwa punkty o dużej aktywności bakterii węglowodorowych (100% wyników płytkowych), a mianowicie 11-33 i 12-38a, lecz zbyt mała ilość stanowisk propanowych nie upoważnia do wysunięcia dalszych wniosków.

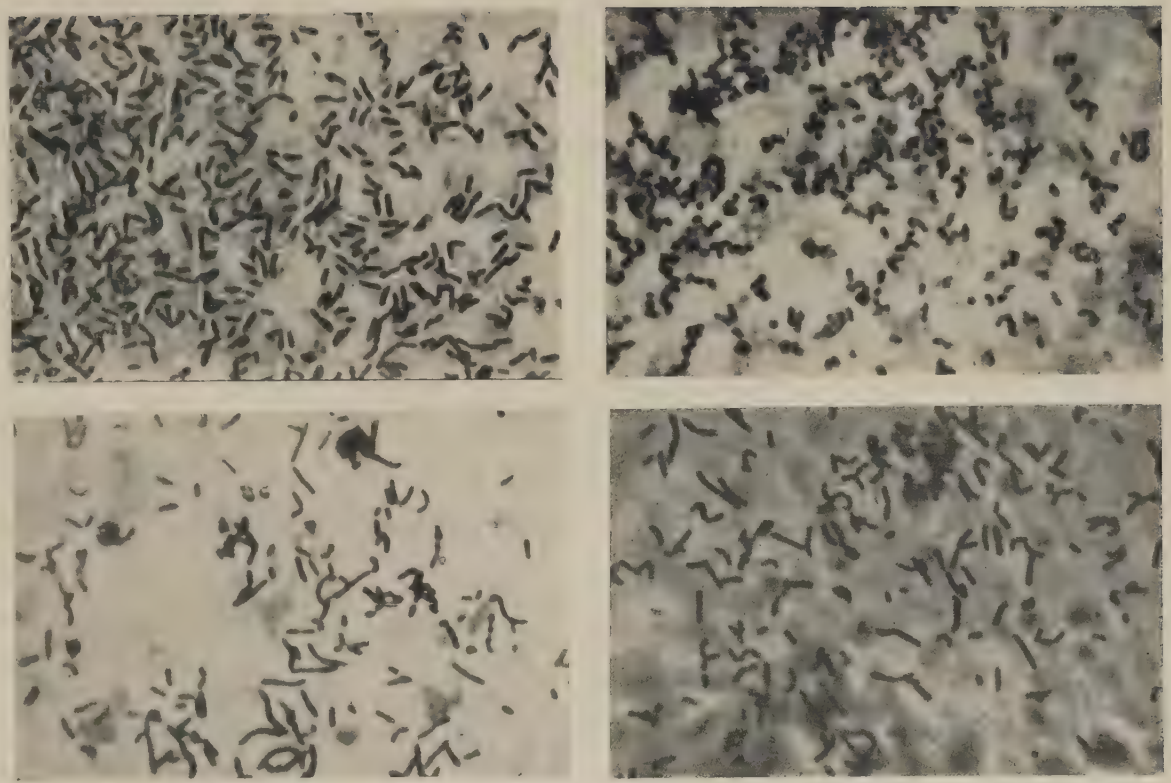
Interesujące jest zestawienie danych geologicznych i objawów bitumicznych gleby z wynikami badań mikrobiologicznych. Jak podaje Olewicz (1958), obszar I położony jest nad południową częścią wysadu solnego, w którym występują wycieki ropne, przejawiające się w anomaliach bitumicznych w glebie na powierzchni. Obszar II położony jest nad północną częścią wysadu solnego, do którego nie dochodzą wyrobiska kopalni. Nie mamy więc wiadomości o wyciekach ropnych. W glebach nad tym obszarem występują również objawy bitumiczne. Brak więc zgodności między wynikami badań geochemicznych i mikrobiologicznych w II obszarze.

Wyjaśnienie powyższego zagadnienia będzie możliwe po przeprowadzeniu dalszych badań geologicznych.

DYSKUSJA

Pracownia Mikrobiologii Instytutu Naftowego przeprowadziła próby zastosowania metody mikrobiologicznej dla celów poszukiwań naftowych. Przy opracowaniu tej metody oparto się na hipotezie, że węglowodory gazowe z warstw głębszych dyfundują do warstw powierzchniowych.

Pierwotnie próbowano wykrywać węglowodory gazowe przy pomocy szczepów wskaźnikowych. Szczepy bakterii wyosobnione w obecności mieszanki powietrza z propanem umieszczano w powierzchniowych warstwach badanych gleb i obserwowano ich rozwój (Luchterowa, 1954, 1956, Luchter i Markiel, 1956).



Rys. 3. Morfologia bakterii propanowych. Preparaty barwione metodą Grama
Fig. 3. Morphology of propane bacteria. Gram stain

Początkowo metoda ta dawała dobre wyniki, lecz kontynuowanie doświadczeń okazało się niemożliwe z powodu warunków klimatycznych. Umieszczane w otworach wskaźnikowe szczepy były zalewane przez opady atmosferyczne.

W związku z tym zmieniono metodę pracy i opierając się na przypuszczeniu, że węglowodorom gazowym powinna towarzyszyć swoista mikroflora, próbę oceny roponośności terenu oparto na wynikach badań laboratoryjnych. Celem tych badań jest wykrycie bakterii węglowodorowych w próbkach gleby z badanych stanowisk.

Stosowana metoda nie pozwala na ilościową ocenę występowania bakterii węglowodorowych, ponieważ na używanym jako podłoże żelu krzemionkowym kolonie zlewają się ze sobą, dlatego też wnioski wyciągano w oparciu o wyniki jakościowe.

Stosowana przez Pracownię Mikrobiologii metoda, polegająca na obserwowaniu bakterii węglowodorowych, jest jednak bardzo pracochłonna ze względu na dużą ilość przygotowanych pożywek. Wymaga też dłuższego czasu (do 30 dni). Jest to jej ujemna strona.

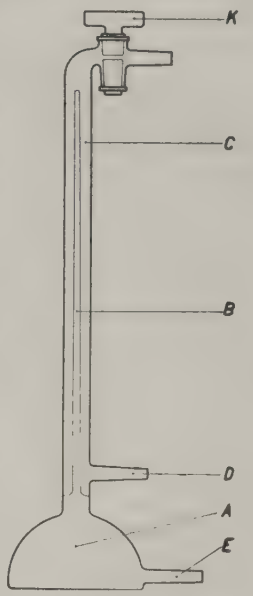
W literaturze spotyka się różne projekty rozwiązania zagadnienia poszukiwań ropy przy pomocy metod mikrobiologicznych. Ogłoszono wiele patentów, w których autorzy podają opis sposobów rozwiązywania szybką metodą tego zagadnienia w oparciu o procesy mikrobiologiczne (Blau, 1942, 1943a,b, Sanderson, 1943, Strawiński, 1954, Taggart, 1941). Jedna z tych metod opiera się na mierzeniu zmian ciśnienia w naczyniu hodowlanym, jakie mają być wywołane przez bakterie podczas zużywania węglowodorów. Podstawą innych metod jest badanie potencjału oksydoredukcyjnego próbek gleby badanego terenu. Inne zalecają wykrywanie produktów działania bakterii w glebie przy pomocy sposobów kolorymetrycznych.

W związku z koniecznością opracowania szybkiej i łatwej w zastosowaniu metody dla powyższych celów zainteresował mnie patent Strawińskiego (1954). Zaproponował on szybką metodę wykrywania mikroflory węglowodorowej przy pomocy bardzo prostego urządzenia, składającego się z dwóch flaszek zakorkowanych korkami gumowymi, przez które przechodzą dwie rurki szklane. Jedna z tych rurek łączy obydwie flaszki i przez nią odbywa się wymiana gazów. W pierwszej flaszce znajduje się badana próbka gleby, w drugiej zaś pożywka. Pierwsza flaszka wypełniona jest mieszaniną metanu z tlenem i dwutlenkiem węgla. Na miejsce zużytego przez mikroorganizmy gazu przechodzi pożywka z drugiej flaszki. Ilość płynu przechodzącego z flaszki drugiej jest miarą zużycia węglowodorów przez bakterie.

W pracowni Mikrobiologii Instytutu Naftowego przeprowadzono próby z zastosowaniem tak skonstruowanego aparaciku. Nie uzyskano

jednak wyników dodatnich przypuszczalnie wskutek tego, że aparatura była nieszczelna. Aparat wprawdzie można łatwo skonstruować, trudności sprawia jednak wprowadzenie do niego materiału badanego. Postanowiono, opierając się na tej samej zasadzie, skonstruować zmodyfikowany aparat o większej szczelności. Równocześnie, przy wykonywaniu prac badawczych nad ściekami, stosowałem aparat do oznaczania biochemicznego zużycia tlenu, postanowiłam więc wypróbować go do badań nad zużyciem węglowodorów przez bakterie. Próbne badania wypadły pozytywnie. Wobec tego, opierając się zarówno na budowie aparatu Strawińskiego, jak aparatu do badań biochemicznego zapotrzebowania tlenu, skonstruowano specjalne urządzenie. Przy jego pomocy przeprowadziłam badania aktywności bakterii węglowodorowych wyizolowanych z terenu Inowrocławia. Strawiński proponuje stosowanie ściśle określonych ilości gazów wchodzących w skład mieszaniny gazowej. W badaniach własnych stosowałam mieszaninę metanu lub propanu i powietrza w stosunku 1 : 3. Przeprowadzono kilka doświadczeń, których celem było sprawdzenie działania aparatury.

Wypróbowane zostały trzy typy aparatów. Dwa z nich różniły się tylko średnicą wewnętrznej rurki (rys. 4). Wygodniejszy w zastosowaniu okazał się typ z rureczką wewnętrzną o przekroju 1 mm. W trzecim typie aparatu, którego dolna część jest rozszerzona, dzięki dużej powierzchni utleniania następuje szybsze zużycie gazów.



Rys. 4. Aparat do badań nad aktywnością bakterii węglowodorowych

Fig. 4. Device for the measurement of hydrocarbon bacteria activity

OPIS APARATU

Aparat (rys. 4) składa się z rozszerzonej dolnej części (A), przechodzącej ku górze w wąską rureczkę o świetle 1 mm (B). Rureczka ta o otwartym górnym końcu otoczona jest płaszczem szklanym (C) wyposażonym w dolnej części w rurkę (D). Rurkę (D) łączy się przy pomocy gumowego węża z naczyniem poziomym. Górna część płaszcza szklanego zaopatrzona jest w wylot z kranem (K). Wylot służy do wprowadzania mieszaniny gazów oraz regulacji ciśnienia przy wprowadzaniu badanej próbki. Część (A) wyposażona jest w boczną rurkę (E), przez którą wprowadza się badaną próbkę.

PRZEBIEG DOŚWIADCZEŃ *

Sterylny aparat napełniano mieszaniną metanu lub propanu oraz powietrza (1 : 3). Następnie do naczynia A wprowadzano zawiesinę bakterii węglowodorowych, którą przygotowano z młodej, 7-10-dniowej ho-

Tabela I

Aktywność bakterii węglowodorowych
Wyniki badań przeprowadzonych w atmosferze mieszanki powietrza z metanem
Biological activity of hydrocarbon-bacteria
Experiments conducted in the mixture of air and methan (1 : 3)

Okres badań w dniach	Ciśnienie atmosferyczne	Wysokość słupa pożywki w rurce w mm		
		Zespoły bakterii		
		13 - 25	11 - 9	13 - 27
Period of incubation (days)	Atmospheric pressure	Level of the fluid in the tube C in mm		
		Mixture of strains		
1	750	25	18	25
2	750	30	21	35
3	745	30	20	27
4	739	30	20	27
5	738	30	20	30
6	737	30	20	30
		13 - 38a	13 - 33	11 - 6
1	746	0	5	0
2	743	41	5	43
3	739	70	0	45
4	738	73	2	55
5	735	70	2	64
6	735	70	2	64
		12 - 9	12 - 16	12 - 21
1	736	0	0	0
2	737	0	0	20
3	738	0	0	65
4	740	13	12	78
5	742	13	12	91
6	746	17	27	102
7	746,5	17	27	102

* Do badania użyto zespołów szczepów metanowych lub propanowych wyizolowanych z terenu Inowrocławia, stosując aparaty o wąskiej dolnej części (I typ), a tylko w kilku doświadczeniach aparat o szerokiej dolnej części (II typ).

dowli. Zawiesinę wprowadzano zawsze w takiej samej ilości, przy czym różnice wagi próbek nie przekraczały 0,001 mg. Ilość wprowadzonego płynu wynosiła 15 ml (I typ aparatu) lub 30 ml (II typ aparatu). Po wprowadzeniu zawiesiny ustalono przy pomocy naczynia poziomującego, zawierającego pożywkę, poziom pożywki w rurce C i umieszczano aparat w temperaturze 20°. Aparat kilkakrotnie wstrząsano. W ciągu całego okresu badań stale o tej samej godzinie notowano ciśnienie atmosferyczne i wysokość słupa pożywki w rurce C po wyrównaniu ciśnień przy pomocy naczynia poziomującego.

Wyniki badań ujęto w tabelach I i II. W miarę zużywania gazu, przy tym samym ciśnieniu zewnętrznym podnosi się poziom płynu w rurce C. Przeprowadzono porównanie aktywności tego samego zespołu szczepów w trzech aparatach tego samego typu. Otrzymano wyniki prawie identyczne.

Porównano również aktywność tego samego zespołu w dwóch aparatach różnego typu (tabela II). Otrzymane wyniki wykazywały, że utlenianie węglowodorów zachodzi około 5-krotnie szybciej w aparacie II.

Tabela II

Aktywność bakterii węglowodorowych
Porównanie wyników uzyskanych na 2 typach aparatów
w atmosferze mieszanki powietrza z propanem (zespół nr 11-6)
Biological activity of hydrocarbon-bacteria
Experiments conducted in mixture of air and propane (1 : 3)
Results obtained with two types of apparates

		Okres badań w dniach Period of incubation (days)					
		1	2	3	4	5	6
Ciśnienie atmosferyczne Atmospheric pressure		739	738	738	742	752	754
Wysokość słupa pożywki w rurce C Level of fluid in tre tube C	Aparat I	0	3	3	8	16	18
	Aparat II	0	5	5	40	75	99

W celu wykazania zależności odczytów od ciśnienia zewnętrznego, uzupełniłam wyniki liczbami ilustrującymi zmiany ciśnienia atmosferycznego. Notowanie zmian poziomu słupa cieczy bez uwzględnienia wahań ciśnienia mogłoby doprowadzić do fałszywego wniosku, że bakterie nie wykazują aktywności lub do zbyt optymistycznej oceny ich działalności.

Badania zostały przeprowadzone z zawiesiną bakteryjną, ale dla celów poszukiwawczych można będzie zamiast zawiesiny wprowadzać badane próbki gleby.

Przy pomocy powyższego aparatu można w szybki sposób ocenić badany teren pod względem aktywności mikroflory węglowodorowej. Otrzymuje się jednocześnie informacje o występowaniu w próbkach gleby drobnoustrojów węglowodorowych oraz o ich aktywności.

Aparat ten umożliwia więc ilościową analizę mikrobiologiczną próbek gleby. Do aparatu zamiast zawiesiny bakterii wprowadza się próbki gleby. Dużą rolę odgrywa odpowiednie przygotowanie próbek. W tym celu z przygotowanej średniej próbki odważa się 150 g gleby, dodaje się 300 ml pożywki i wstrząsa przez 15 minut. Następnie do aparatu napełnionego mieszaniną węglowodorów z powietrzem wprowadza się 30 ml tej mieszaniny (do aparatu z rozszerzoną dolną częścią).

Codziennie, w ciągu całego okresu badań należy notować zmianę wysokości słupa pożywek, ciśnienia atmosferycznego i temperatury.

Po przeprowadzeniu tych wstępnych doświadczeń dalsze prace przeprowadzam z zastosowaniem wzoru, który ułatwi porównywanie wyników. Praca ta wykaże, czy opisany aparat będzie mógł w pełni służyć do określenia aktywności bakterii węglowodorowych.

LITERATURA

Blau L. W. 1942: Process for Locating Valuable Subterranean Deposits. *U. S. Patent Office* 2,269,889.

Blau L. W. 1943a: Geochemical prospecting. *U. S. Patent Office* 2,330,026.

Blau L. W. 1943b: Process for Locating Valuable Subterranean Deposits. *U. S. Patene Office* 2 337,443.

Karcew A. A., Tabasaranski Z. A., Subbota M. I., Mogilewski G. A. 1954: Geochimiczeskije mietody poiskow i razwiedki nieftianych i gazowych miestorożdenii. Moskwa, Gostoptechizdat.

Luchter A. 1954: Próby zastosowania bakterii jako wskaźników dla terenów roponośnych. *Biuletyn Prac I. N.* nr 34 : 9.

Luchter A. 1955: Zdolność wykorzystania różnych węglowodorów przez niektóre bakterie z terenów roponośnych. *Acta Microbiol. Polon.* 4 : 271.

Luchter A. 1956: Mikrobiologiczna metoda poszukiwań złóż naftowych. *Zeszyty Naukowe Akademii Górniczo Hutniczej w Krakowie, Geologia,* 1: 45.

Luchter A. i Markiel E. 1956: Wpływ gazu ziemnego na rozwój bakterii metanowych w glebie. *Acta Microbiol. Polon.* 5 : 141.

Mogilewski G. A. 1940: Bakterialnyj mietod razwiedki na nieft i prirodnyje gazy. *Razwiedka niedr.* 12 : 32.

Mogilewski G. A. 1947: Diesiat let gieomikrobiołogiczeskoj razwiedki. *Razwiedka niedr.* 5: 48.

Olewicz. L. 1958: Perspektywy roponośności w okolicy Inowrocławia w świetle nowszych badań. *Prace Instytutu Naftowego* (w druku).
Sanderson R. T. 1942: Geomicrobiological Prospecting. *U. S. Patent Office* 2,294,425.
Strawiński R. J. 1954: Prospecting. *U. S. Patent Office* 2,665,237.
Taggart M. S. 1941. Oil Prospecting Method. *U. S. Patent Office* 2,234,637.

A. Luchter

SOME OBSERVATIONS ON THE VALUE OF MICROBIOLOGICAL METHODS IN SOIL-PROSPECTING IN THE REGION OF INOWROCŁAW

Summary

The Department of Microbiology of the Polish Petroleum Institute was trying to ascertain the value of microbiological methods in prospecting of oil and gas deposits in the region of Inowrocław.

The method was based on isolation of specific bacterial microflora, able to utilize propane or methane as a sole source of carbon and energy. These bacteria were isolated from samples of soil taken from survey bore-holes from the depth of 2—3 meters. Amony 55 examined survey points 18 delivered propane bacteria, 12 — methane bacteria, 4 — both groups together.

The results of survey were put on the map of Inowrocław region (fig. 1).

Two distinct areas could be distinguished (fig. 2). The southern area contained the majority of propane bacteria isolation points. This area is located above the southern part of the salt plug, in which the occurence of soil seepage has been proved.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 45-50

T. Kłosowska

BADANIA NAD BAKTERIOBÓJCZYM DZIAŁANIEM BOROWIN

Z Pracowni Mikrobiologii Zakładu P. P. „Obsługa Techniczna Uzdrowisk"
w Szczawnie-Zdroju

Wpłynęło dnia 10 lipca 1957 r.

Borowiny stosowane w lecznictwie są jednym z rodzajów peloidów. Według definicji ustalonej na Międzynarodowym Kongresie Balneologicznym w r. 1937 (B e n a d e, 1948), peloidy są to utwory powstałe na skutek naturalnych przemian geologicznych, które w postaci rozdrobnionej po zmieszaniu z wodą służą do celów leczniczych w formie kąpieli i okładów.

Do peloidów zalicza się: szlamy nieorganiczne i organiczne, torfy (borowiny), muły i glinki.

Początkowo zasady stosowania peloidów w lecznictwie oparte były wyłącznie na doświadczeniach klinicznych. Na wymienionym Kongresie ustalono zakres badań peloidów, obejmujący badania botaniczne, fizykochemiczne i mikrobiologiczne.

W badaniach mikrobiologicznych uwzględnia się:

1. oznaczanie mikroflory rodzimej i jej wpływ na właściwości peloidów,

2. zdolność rozwoju bakterii chorobotwórczych (wzorcami są tu *Micrococcus pyogenes v. aureus* i *Bacterium pyocyaneum*) po wprowadzeniu ich do peloidów.

Zagadnienie działania peloidów na bakterie chorobotwórcze stało się w ostatnich dziesiątkach lat przedmiotem licznych prac. Większość znanych nam badań dotyczy szlamów jeziornych. Bakteriobójcze własności szlamów stwierdziła w r. 1943 W o ł k o w a (1952), badając szlam z jeziora Tambukańskiego. Inni autorzy potwierdzili jej wyniki badając szlamy różnych jezior.

D i e h l (1937) zbadał szlam źródła gorącego w Piszczanach oraz fango z Bataglii i Eifelfango. Nie stwierdził on własności bakteriobójczych

wymienionych szlamów. Według niego bakterie chorobotwórcze mogą się dostawać do szlamu z skóry chorego i odwrotnie.

Nad bakteriobójczymi właściwościami borowin pracował także Urbański (1940). Stwierdził on, że bakterie chorobotwórcze, w szczególności *Micrococcus pyogenes v. aureus* i *Escherichia coli*, pod wpływem działania borowiny z torfowiska, znajdującego się w pobliżu uzdrowiska Elster, giną po kilku dniach.

W polskiej literaturze medycznej znajdują się luźne wzmianki na temat bakteriobójczego działania naszych borowin (Zubrzycki, 1951). Nie są one jednak udokumentowane pracami naukowymi.

W pracowniach P. P. „Obsługa Techniczna Uzdrowisk" w Szczawnie-Zdroju od wielu lat przeprowadza się badania fizykochemiczne różnych peloidów używanych do leczenia w naszych uzdrowiskach. W ostatnich latach prowadzi się również badania mikrobiologiczne tych utworów.

Celem tych badań jest poznanie niektórych właściwości biologicznych peloidów oraz zbadanie wpływu procesów technologicznych, takich jak: suszenie, zamrażanie, podgrzewanie, rehabilitacja, na te właściwości.

W ramach tych prac w pierwszym rzędzie postanowiono przebadać borowiny pochodzące ze złóż rodzimych wszystkich rejonów Polski pod względem ich własności bakteriobójczych lub bakteriostatycznych.

W pracy niniejszej starano się, przy zachowaniu jednakowych warunków badań, poznać oddziaływanie borowin pochodzących z różnych złóż na żywotność bakterii wzorcowych: *M. pyogenes v. aureus* i *Escherichia coli*.

Borowiny użyte do badań pochodziły z następujących złóż:

Rejon północny: Kołobrzeg, Połczyn, Ciechocinek (Wołuszewo), Wieniec Kujawski, Inowrocław (Pakość);

Rejon środkowy: Busko-Zdrój, Nałęczów (Marianka Ożarowska);

Rejon południowo-zachodni: Świeradów (Góry Izerskie), Cieplice (Jakuszec) — Jeleniogórskie; Batorów, Topieliska, Trzebieszowice — Ziemie Kłodzkie;

Rejon Podkarpacki: Ludzimierz (Nowy Targ), Krynica (Mochnaczka Wyżna), Iwonicz (Targowiska).

Próby borowin pobrane były ze złóż za pomocą świdra, w okresie od kwietnia do grudnia 1956 roku. Do badań używano średniej próby z danego złoża.

METODYKA BADAŃ

Po zebraniu próbek z borowin, z każdej z nich pobierano po około 200 g i przygotowywano papkę w następujący sposób: do borowiny naturalnej wilgotnej dodawano sterylnej wody destylowanej w ilości potrzebnej do otrzymania gęstej

papki o konsystencji używanej do okładów. Po dokładnym wymieszaniu pozostawiano ją pod przykryciem do napęcznienia na 24 godzin w temperaturze pokojowej. Równocześnie na agar skośny wysiewano bakterie testowe otrzymane z Muzeum Szczepów PZH w Warszawie, a mianowicie: *M. pyogenes v. aureus nr 81/46* PZH Warszawa, 1946, *Escherichia coli nr 2617/51* PZH Warszawa, 1951.

Po 24 godzinach odważano do płytek Petriego o średnicy 10 cm po 50 g tej papki.

24-godzinną hodowlę bakterii testowych na agarze skośnym zmywano 10 ml roztworu soli fizjologicznej. Otrzymaną zawiesiną bakterii szczepiono poszczególne borowiny, dając po 0,5 ml zawiesiny na każde 50 g papki.

Obecność *M. pyogenes v. aureus* w zaszczepionych borowinach badano w następujący sposób: po dokładnym wymieszaniu odważano 1 g zaszczepionej borowiny i przenoszono go do probówki z 10 ml sterylnej wody destylowanej. Zawiesinę wytrząsano przez 20 minut i pozostawiano przez 1 godzinę do odstania się. Następnie pobierano 1 ml płynu znad osadu, dawano do płytki Petriego i zalewano agarem odżywczym. Obecność *M. pyogenes v. aureus* badano w zaszczepionych borowinach co 24 godziny; oznaczenia powtarzano do czasu stwierdzenia braku wzrostu.

Zaznaczyć należy, iż podczas tych badań na płytkach obok gronkowca wyrastała zazwyczaj mikroflora swoista, charakterystyczna dla danej borowiny. Mikroflora ta rozwijała się na płytkach na przykład w postaci rozlanego nalotu albo też tworzyła różnego rodzaju kolonie. Kolonie gronkowca odróżniano od innych przy pomocy kontroli preparatów mikroskopowych.

W skład swoistej mikroflory borowin wchodziły zwykle bakterie przetrwalnikujące lub drobne pałeczki.

E. coli oznaczano za pomocą próby fermentacyjnej (według tymczasowej metodyki opracowanej przez PZH dla borowin), wysiewając próbki zaszczepionej borowiny na pożywkę Eijkmana, a następnie sprawdzając wynik na agarze Endo. Jako wynik negatywny przyjmowano miano *coli* powyżej 50.

Doświadczenia z *E. coli* przeprowadzano tylko na tych borowinach, które przed zaszczepieniem ich tymi bakteriami nie wykazywały fermentacji na pożywce Eijkmana.

WYNIKI BADAŃ

Wyniki zestawiono w tabeli I i zilustrowano na fot. 1a, 1b, 2a i 2b. Przebadane borowiny, jak widać, można podzielić na dwie grupy pod względem ich działania na bakterie wzorcowe. Pierwsza, o wyraźnym działaniu bakteriobójczym: *M. pyogenes v. aureus*, ginie w ciągu 24 godzin, *E coli* w ciągu 8-9 dni. Grupa druga odznacza się kilkakrotnie słabszym działaniem.

Borowiny pierwszej grupy pochodzą ze złóż Świeradów, Cieplice, Topieliska, Ludzimierz. Według badań laboratorium fizykochemicznego „Obsługi Technicznej Uzdrowisk" w Szczawnie zaliczyć je można do typu borowin wysokich. Borowiny drugiej grupy należą do typu niskiego lub przejściowego.

W drugiej serii doświadczeń zbadano wpływ temperatury na żywotność *M. pyogenes v. aureus* w wybranych borowinach. Doświadczenie

przeprowadzono w temperaturze 20 i 37°. Do badań użyto następujących borowin: z grupy pierwszej ze złoża w Ludzimierzu i z grupy drugiej ze złoża w Krynicy.

W celu możliwie dokładnego określenia czasu, po którym następuje zmniejszenie się ilości kolonii bakterii wzorcowych na płytkach z aga-

Tabela I

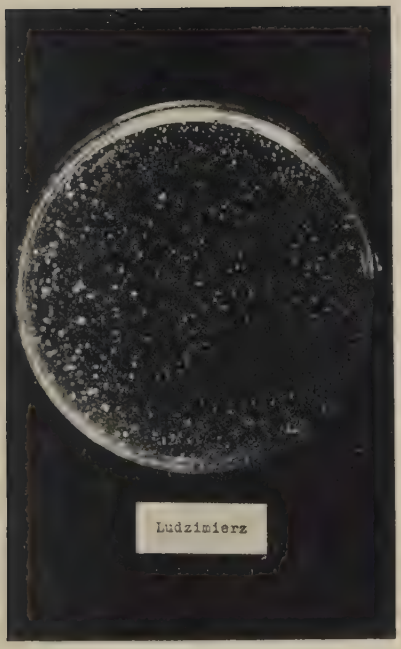
Okres przeżywania (w dniach) bakterii testowych w borowinach z różnych złóż
Temperatura 20°
Survival - period (in days) of test bacteria in marshes
Temperature of incubation 20°

Rejon kraju Part of the country	Nazwa złoża borowiny Place of sampling	*Micrococcus pyogenes v. aureus*	*Escherichia coli*	Grupa borowin Group of marshes
Północny	Kołobrzeg	9	>30	2
Northern	Połczyn	6	·	2
	Ciechocinek	9	·	2
	Wieniec Kujawski	9	·	2
	Inowrocław	9	·	2
Środkowy	Busko	9	·	2
Middle	Nałęczów	6	·	2
Południowo-	Świeradów	1	8	1
-Zachodni	Cieplice	1	8	1
South-Western	Batorów	6	>30	2
	Topieliska	1	9	1
	Trzebieszowice	9	·	2
Podkarpacie	Ludzimierz	1	8	1
	Krynica	10	>30	2
	Iwonicz	9	·	2

rem odżywczym, próbki borowin przechowywanych w temperaturze 20 i 37° pobierano do badań w następujących okresach: bezpośrednio po zakażeniu, po 1, 2, 3, 6, 8, 10 i 24 godzinach.

W borowinach przechowywanych w temperaturze 20° ilość kolonii gronkowca wyraźnie zmniejsza się dopiero po 24 godzinach. Wyniki badań przedstawiają załączone zdjęcia. W borowinie ze złoża w Ludzimierzu po 24 godzinach nie stwierdzono już obecności gronkowca, natomiast w borowinie ze złoża w Krynicy ilość kolonii tej bakterii po upływie tego czasu była jeszcze duża.

W temperaturze 37° zmniejszenie ilości kolonii na płytkach zaznacza się już po 3 godzinach. Po 10 godzinach w borowinie ze złoża w Ludzimierzu nie stwierdzono już obecności *M. pyogenes v. aureus*, natomiast w borowinie z Krynicy ilości tej bakterii były jeszcze znaczne.



Fot. 1a — Phot. 1a

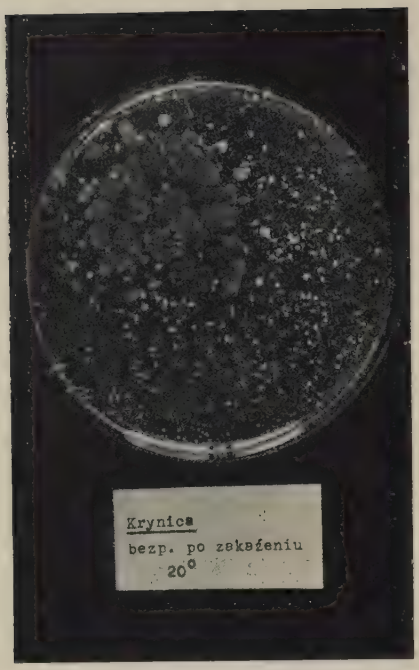
Fot. 1b — Phot. 1b

Bakteriobójcze działanie borowin na *M. pyogenes v. aureus*
Fot. 1a i b — Borowina z Ludzimierza

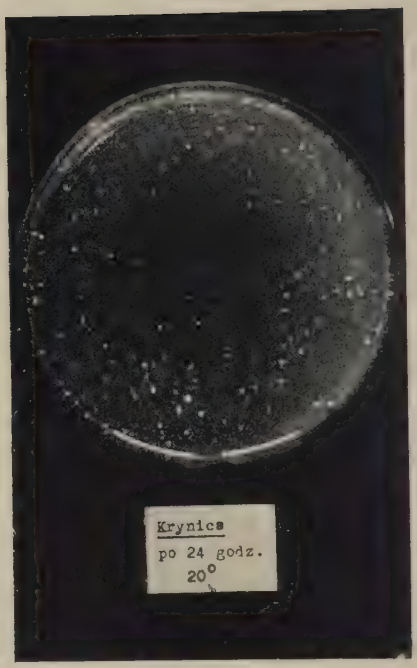
Bacteriocidal effect of marshes on *M. pyogenes v. aureus*
Phot. 1a a. b — Marsh from Ludzimierz

a — Wysiew borowiny bezpośrednio po zaszczepieniu jej gronkowcem
b — Wysiew borowiny po upływie 24 godzin od zaszczepienia jej gronkowcem

a — Agar plate poured immediately after inoculation of the marsh-sample with staphylococci
b — Agar plate poured 24 hours after the inoculation of the marsh-sample with Staphylococcal



Fot. 2a — Phot. 2a



Fot. 2b — Phot. 2b

Bakteriobójcze działanie borowin na *M. pyogenes v. aureus*
Fot. 2a i b — Borowina z Krynicy

Bacteriocidal effect of marshes on *M. pyogenes v. aureus*
Phot. 2a a. b — Marsh from Krynica

a — Wysiew borowiny bezpośrednio po zaszczepieniu jej gronkowcem
b — Wysiew borowiny po upływie 24 godzin od zaszczepienia jej gronkowcem

a — Agar plate poured immediately after inoculation of the marsh-sample with staphylococci
b — Agar plate poured 24 hours after the inoculation of the marsh-sample with Staphylococcal

WNIOSKI

1. Wśród borowin krajowych znaleziono borowiny odznaczające się bakteriobójczym działaniem na chorobotwórcze bakterie wzrocowe — *M. pyogenes v. aureus* i *E. coli*. Borowiny te pochodziły ze złóż w Świeradowie, Cieplicach, Topieliskach i Ludzimierzu.

2. Stwierdzono, że borowiny mające właściwości bakteriobójcze pochodzą z torfowisk wysokich.

3. Wśród borowin typu przejściowego i niskiego ze złóż w Kołobrzegu, Połczynie, Ciechocinku, Wieńcu Kujawskim, Inowrocławiu, Busku, Nałęczowie, Batorowie, Trzebieszowicach, Krynicy i Iwoniczu nie znaleziono takich, które miałyby właściwości bakteriobójcze tak rozwinięte jak w borowinach typu wysokiego.

4. Wraz z wzrostem temperatury przechowywania borowin do 37° wzrastało ich działanie bakteriobójcze.

Serdeczne podziękowanie składam prof. dr J. Gołębiowskiej za cenne rady i wskazówki przy wykonywaniu tej pracy.

LITERATURA

Benade W., 1938: Einige Erleuterungen zu dem Bericht über die Arbeiten des Internationalen Peloid Komitees. *Der Balneologe*, **9** : 419.

Diehl K., 1937: Quantitative und qualitative Untersuchungen über den Keimgehalt verschiedener Heilschlammarten vor und nach der Applikation. *Der Balneologe*, **3** : 148.

Urbański H., 1940: Über die antibakterielle Wirkung des Elsterer Moors. *Der Balneologe*, **7** : 193.

Wołkowa O. J., 1952: Antibakterialnyje swoistwa lieczebnych griaziej i usłowija ich formirowanija. *Mikrobiołogija*, **21** : 177.

Zubrzycki J., 1951: Czynniki lecznicze borowiny rodzimej a schorzenia narządów rodnych kobiety. *Balneologia Polska*, **1** : 18.

T. Kłosowska

INVESTIGATIONS ON THE BACTERICIDAL ACTION OF MARSHES

Summary

The investigations concerned the bactericidal action of soils from marshy areas in Poland. As test bacteria *Micrococcus pyogenes var. aureus* and *Escherichia coli* were used. It was found that these bacteria died very quickly in soil samples taken from the area Świeradów, Cieplice, Topieliska and Ludzimierz (table I), which belong to the high-moor type. The remaining soil samples, belonging to the low-moor or intermediate types showed a less intense bactericidal action (Phot. 1a, 1b, 2a und 2b).

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 51-64

A. Kozłowska

FESTSTELLUNG VON ORGANISCHEN UND ANORGANISCHEN SÄLZEN IN GESUNDEN UND MIT VIRUS X BEHAFTETEN TABAKBLÄTTERN MITTELS DER KONDUKTOMETRISCHEN METHODE

Institut für Botanik der Landwirtschaftlichen Hochschule in Kraków

30 September 1957

Die Entwicklung des Virusproteins im Pflanzengewebe beinflußt dessen Stoffwechsel. Der Tabakmosaikvirus (T. M. V.) bewirkt eine Anreicherung der Aminosäuren in den Blättern der Tabakpflanze (Meneghini, Delwiche, 1951, Mortus 1951, Commoner u. a., 1953). Laloraya (1955a) stellte einen Unterschied fest in der Zusammensetzung der Aminosäuren und der organischen Säuren in den Blättern der Bohne, die mit dem Gelbmosaikvirus infiziert waren. In den Tabakmosaikvirus und Kräuselkrankheit (tobacco leaf curl) infizierten Tabakblättern wächst die Asparaginsäure an und es treten die in den gesunden Blättern nicht vorkommenden Histidin, Lysin und Asparagin (Laloraya u. Govind, 1955b) auf. Dagegen fehlt mit Mosaikvirus befallenen *Trichosanthes anguina* Blättern die Asparaginsäure, das Valin und das Methionin (Rajarao u. a., 1956).

Zwecks Feststellung der Unterschiede in den Säften von gesunden und mit Virus X behafteten Tabakblättern, bediennten wir uns der konduktometrischen Methode, die es ermöglicht sowohl organische als anorganische Salze, die sich in den Lösungen befinden, festzustellen.

KONDUKTOGRAMME DER SÄFTE VON GESUNDEN TABAKBLÄTTERN

Für die Versuche wurden Gewächshauspflanzen der Tabaksorte „White Burley" benutzt, im vier bis sechs Blattstadien. Die Untersuchungen wurden im Frühling, im Sommer und im Herbst 1956 durchgeführt.

Wir zerrieben in einem Porzellanmörser nicht infizierte 10-14 cm lange Tabakblätter, drückten den Saft aus und zentrifugierten denselben

bei 3000 Umdreh./Min. Die Proteine wurden in den Säften bei 100° gefällt und zentrifugiert. 5 ml des erhaltenen Filtrats wurde mit destillierten H_2O, im Verhältnis von 1 : 50, verdünnt und mit 0,1 N HCl bei einer Temperatur von 25° titriert. Jedesmal wurden 0,2 ml HCl hinzugefügt. Der Widerstand mit Ohms gemessen, wurde auf die Leitfähigkeit umgerechnet. Für Widerstandsmessung wurde „Conductivity bridge" Model R. D. Industr. Instr. Yersey City, benutzt.

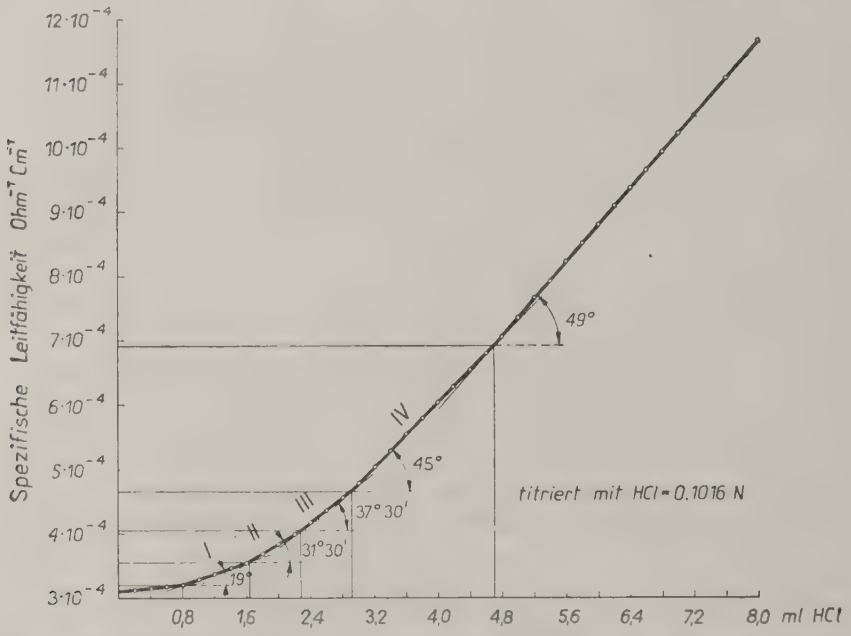


Abb. 1. Konduktogramm des Saftes von Tabakblättern mit HCl titriert (28. VIII. 1956)
Rys. 1. Konduktogram soku z liści tytoniu miareczkowanego HCl (28. VII. 1956)

Die Konduktogramme wiesen 5 Brechpunkte auf der Titrierkurve auf, welche 4 Segmenten entsprachen (Kozłowska, Wyczałkowska, 1956, Kozłowska 1957) (Abb. 1).

Unter den Konduktogrammen, welche mit Säften der in demselben Stadium sich befindenden Tabakblätter im Frühling, Sommer und Herbst aufgeführt wurden, traten gewisse Unterschiede im Charakter der Titrierkurve auf.

Die Konduktogramme der Frühlingsblätter stiegen schnell in die Höhe, dagegen waren diejenigen der Herbstblätter flach. Die Anzahl der Segmente war jedoch in allen Fällen dieselbe.

Um festzustellen, was die Segmente auf der Titrierkurve bedeuten, wandten wir drei Methoden an. Die erste Methode beruhte darauf, daß wir vor dem Titrieren die Salze der Säuren, die sich in dem untersuchten Saft wahrscheinlich befanden, oder auch nicht befanden, hinzufügten. Die zweite Methode, welche die erste bestätigen sollte, beruhte darauf, daß wir vor dem Titrieren in den untersuchten Lösungen, diese Säuren fällten, welche mittels der ersten Methode festgestellt worden waren. Schließlich führten wir die Konduktogramme von reinen Lösungen derselben Salze aus, welche in den Säften der Tabakblätter gefunden worden waren.

Die vier Segmente, die wir auf dem Konduktogramme des Saftes von Tabakblättern feststellten, konnten höchst wahrscheinlich den aus den Salzen verdrängten: $KHSO_4$, der Phosphorsäure, Citronensäure und Apfelsäure entsprechen. Das Vorkommen dieser Salze in den Tabakblättern ist schon von vielen Autoren festgestellt worden (Vickery u. a., 1940). Das Calcium-oxalat, welches in den Tabakblättern vorkommt, geht nicht in die Lösung über.

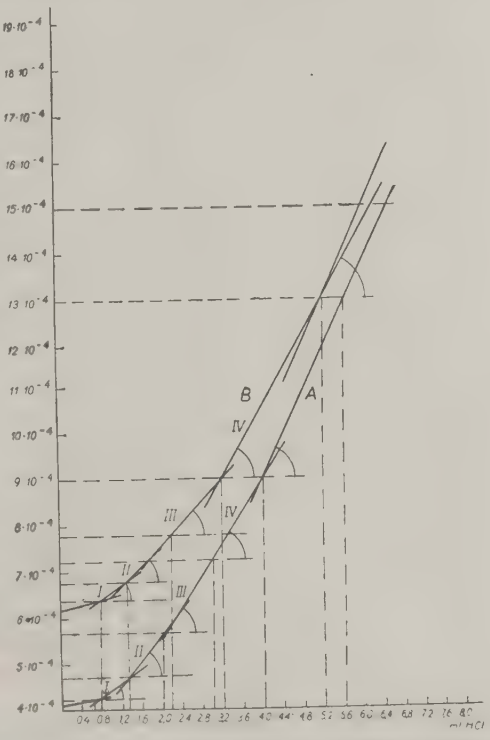


Abb. 2. *A*. Konduktogramm des Saftes von Tabakblättern mit HCl titriert (31. VIII. 1956).
B. Konduktogram desselben Saftes nach Zusatz von 2 ml 0,1 N KH_2PO_4

Rys. 2. *A*. Konduktogram soku z liści tytoniu miareczkowanego HCl (31. VIII. 1956)
B. Konduktogram tego samego soku po dodaniu 2 ml 0,1 N KH_2PO_4

Fir fügten zu 5 ml mit 250 ml H_2O verdünnten Saftes 2 ml 0,1 N KH_2PO_4 hinzu. Zwei parallele Konduktogramme wurden ausgeführt: das erste mit reinem verdünnten Pflanzensaft, das zweite mit hinzugefügten KH_2PO_4. Beide Konduktogramme wiesen 5 Brechpunkte auf, die 4 Segmenten entsprachen (Abb. 2A u. B).

Ein analoges Experiment führten wir aus, indem wir 2 ml 0,1 N K_2SO_4 vor dem Titrieren zum verdünnten Saft hinzufügten. Das Resultat war demjenigen ähnlich, das nach Zusatz von KH_2PO_4 erhalten wurde: auf dem Konduktogramm erschienen 4 Segmente.

Ebenso wurden 4 Segmente auf dem Konduktogramme erhalten, wenn vor dem Titrieren 2 ml 0,1 N Kaliumcitrat sowie auch 2 ml 0.1 N Kaliummalat dem Safte der Tabakblätter hinzugefügt wurden.

In allen hier besprochenen Konduktogrammen verursachte der Zusatz von den oben erwähnten Salzen eine Verschiebung der Höhepunkte in einem verschiedenen Grade. Es erfolgte auch eine Verschiebung aller Brechpunkte, und in der Folge änderte sich auch die Länge aller Segmente.

Um sich zu überzeugen, wie der Zusatz von in den Tabakblättern nicht festgestellten Salzen das Konduktogramm beeinflußt, wurden im ersten Fall 2 ml 0,1 N Kaliumsulfit zugesetzt. Alle vier Konduktogramme tinsalzlösung, im dritten Fall Kaliumasparaginat, schließlich in vierten Fall 2 ml 0,1 N Kaliumsulfit zugesetzt. Alle vier Konduktogramme wiesen auf den Titrierkurven im Vergleich zur Kontrolle 6 Brechpunkte auf, welche 5 Segmenten entsprachen. Der letzte Brechpunkt erschien auf den Titrierkurven in allen Fällen höher als auf den Kontrollen, denen keine fremden Salze zugesetzt worden waren. Trotzdem die erwähnten Salze 0,1 N waren und in derselben Anzahl (2 ml) zu den verdünnten Tabaksäften zugesetzt wurden, traten auf der Titrierkurve die höchsten Brechpunkte in verschiedener Höhe auf.

Die Tatsache, daß auf den Konduktogrammen neue Segmente auftraten, wenn Salze zugesetzt wurden, die sich nicht in Tabaksäften befanden und umgekehrt, wenn keine Segmente erschienen, als die zugesetzten Salze schon im Safte vorhanden waren, gestattet uns, den folgenden Schluß zu ziehen.

Die vier auf der Titrierkurve sichtbaren Segmente entsprachen den durch HCl aus den Salzen verdrängten schwächeren Säuren. Im Tabaksaft befinden sich also die folgenden Salze: Sulfate, Phosphate, Zitrate und Malate. Das Verdrängen der einzelnen Säuren hängt von deren Dissoziationskonstanten ab, und zwar von dem niedriegsten, ersten Dissoziationsgrad der Apfelsäure bis zum zweiten höchsten Dissoziationsgrad der Schwefelsäure.

Die Interpretation der vier auf der Titrierkurve autretenden Segmente, wurde mittels der Fällungsmethode bestätigt. Die Phosphate wurden auf zweierlei Art versetzt: 1) durch Zusatz von 0,2 ml 0,1 N $CaCl_2$ und 2) durch Zusatz von 0,2 ml 0,1 N Ammonmolybdat zu 5 ml Tabaksaft. In beiden Fällen erschienen auf den Konduktogrammen der Tabaksäfte nach Zentrifugierung des Niederschlages, der P enthielt, drei und nicht vier Segmente (Abb. 3A). Das ausgefallene Phosphat erschien nicht

auf dem Konduktogramm. Nachdem das versetzt wurde, wurden dem Filtrat 2 ml 0,1 N Kaliumzitrat zugesetzt. Auf dem erhaltenen Konduktogramm erschienen so wie vorher 3 Segmente. Ein ähnliches Bild erhielten wir nach Zusatz von 2 ml 0,1 N Kaliummalat zum Filtrat.

In den folgenden Experimenten wurden nach dem Ausfallen der Phosphate, 2 ml 0,1 N $BaCl_2$ Lösung, zwecks Versetzung der Sulfate zugesetzt. Der in HNO_3 unlösliche Niederschlag enthielt Sulfate. Auf dem Konduktogramm war nur ein Segment sichtbar (Abb. 3B). Zwecks Interpretierung dieses Segmentes wurden 2 ml 0,1 N Kaliumzitrat zugesetzt. Auf dem Konduktogramm erschienen 2 Segmente. Im untersuchten Saft wurde außer Sulfaten auch Bariumzitrat durch Zuzatz von $BaCl_2$ versetz. Das auf dem Konduktogramm zurückgebliebene Segment entsprach nach Ausfällung des Phosphates, Zitrates und das Sulphates, der Apfelsäure.

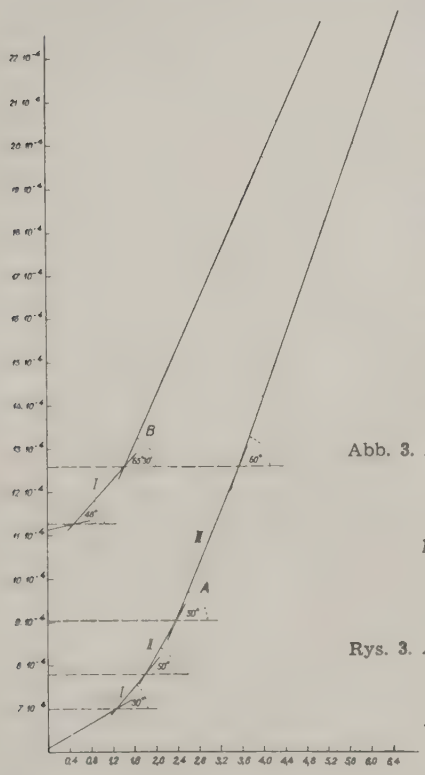


Abb. 3. *A.* Konduktogramm des Saftes von Tabakblättern nach Fallung der Phosphate durch Zusatz von $CaCl_2$ vor dem Titrieren

B. Konduktogramm desselben Saftes nach Fällung der Sulfate und Zitrate durch Zusatz von $BaCl_2$ vor dem Titrieren

Rys. 3. *A.* Konduktogram soku po uprzednim wytrąceniu fosforanu przez dodanie $CaCl_2$

B. Konduktogram tego samego soku po wytrąceniu siarczanu i cytrynianu przez zadanie $BaCl_2$

Zwecks Feststellung, daß in den Pflanzensäften $KHSO_4$ mit HCl konduktometrisch titriert wird, wurden folgende Experimente durchgeführt. Die Tabaksämlinge wurden auf Sandkulturen, im ersten Fall auf voller Nährlösung, im zweiten Fall auf einer Nährlösung ohne SO_4 Jone kultiviert. Die mit den Säften dieser Tabakblätter durchgeführten Konduktogramme, zeigten im ersten Fall 4 Segmente, im zweiten 3 Segmente. Nach Zusatz von $BaCl_2$, stellten wir im ersten Fall im Niederschlag **Sulfate fest.**

KONDUKTOGRAMME DER SALZLÖSUNGEN, DIE IN TABAKSÄFTEN AUFTRETEN

Die entgültige Bestättigung der richtigen Interpretierung der Konduktogramme der Säfte von jugendlichen Tabakblättern, war die Gewinnung analoger Konduktogramme, wenn die in den Tabakblättern auftretenden Salze titriert wurden.

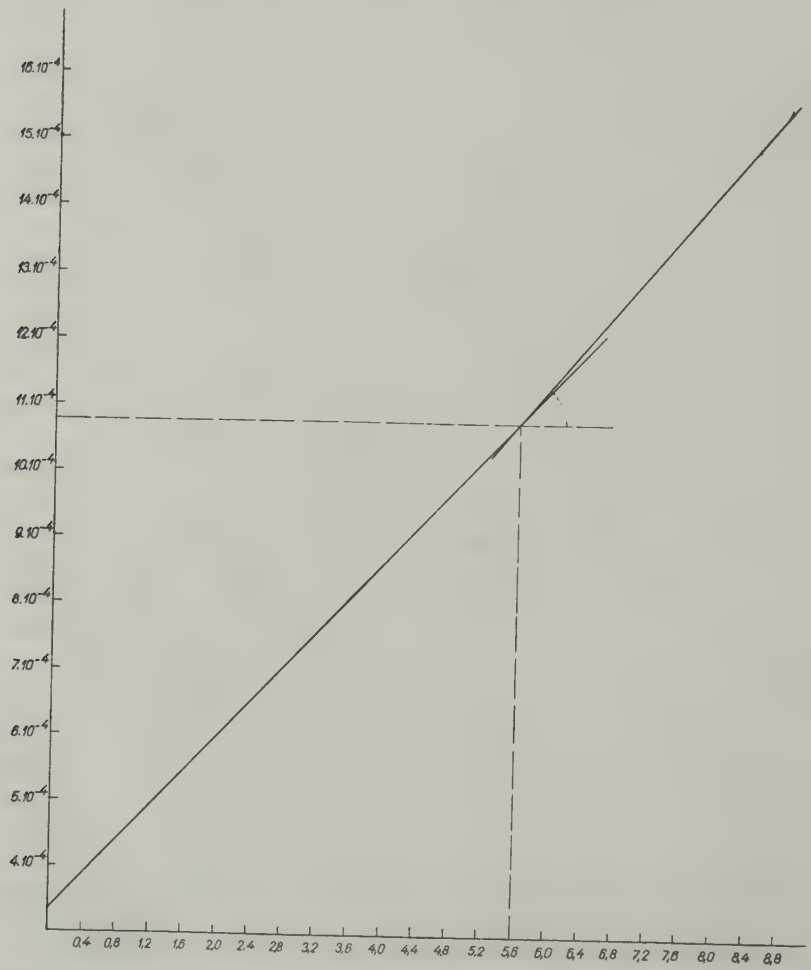


Abb. 4. Konduktogramm der Mischung $K_2SO_4 + KH_2PO_4$ (0,1 Normallösungen) mit HCl titriert

Rys. 4. Konduktogram mieszaniny $K_2SO_4 + KH_2PO_4$ 0,1 N

Sulphate, Phosphate, Zitrate und Malate, saure und neutrale, wurden konduktometrisch titriert, zuerst einzeln und dann in einer Mischung, 2 ml 0,1 N der einzelnen Salzlösungen wurden jedes mal mit 1 : 50 H_2O verdünnt. Die Lösungen wurden mit 0,1 N HCl titriert. Es wurden folgende Resultate erzielt.

Das Konduktogramm der 0,1 N Lösung K_2SO_4 zeigte eine in die Höhe steigende Kurve, ohne Brechungen. Eine ähnliche Kurve wurde beim Titrieren des KH_2PO_4 erhalten. Dagegen trat bei einer Mischung von $KH_2PO_4 + K_2SO_4$ eine Brechung der Titrierkurve in der Höhe von 5,56 cm auf (Abb. 4). Die Konduktogramme der Salze schwachen Säuren, und zwar von Kaliumzitrat und Kaliummalat, sowohl des sauren als auch neutralen, gaben auf der Titrierkurve im erstem und im zweiten Fall zwei Brechungen, die je ein Segment bildeten (Abb. 5). Das Konduktogramm einer Mischung, die aus 2 ml 0,1 N sauren Kaliummalat, 2 ml 2 ml 0,1 N KH_2PO_4 bestand und mit 250 ml H_2O verdünnt 0,1 N sauren Kaliumzitrat und wurden, zeigte auf der Titrierkurve 4 Brechpunkte, somit 3 Segmente, die den durch HCl verdrängen Säuren, etnsprachen. Ein Zusatz von K_2SO_4 zu der erwähnten Lösung, verursachte das Auftreten des vierten Segments, das dem von HCl verdrängten $KHSO_4$ entsprach. Der Zusatz von einzelnen Salzen in doppelter Quantität zu den erwähnten Mischlösungen verursachte auf den Konduktogrammen eine Verlängerung nicht nur eines einzelnen sondern alle Segmente.

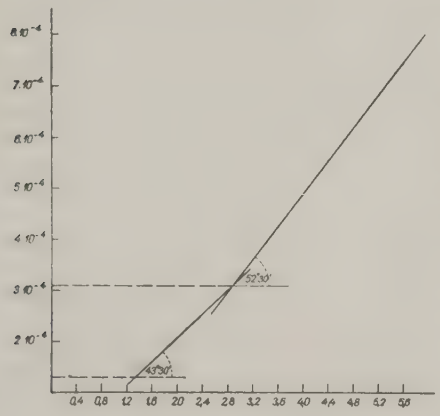


Abb. 5. Konduktogramm 0,1 N Kaliumzitrat Lösung mit 0,1 N HCl titriert

Rys. 5. Konduktogram 0,1 N cytrynianu potasu

KONDUKTOGRAMME DER SÄFTE VON MIT DEM VIRUS X INFIZIERTEN TABAKBLÄTTERN.

Tabaksämlinge in Vier-Blattstadium wurden am zwei Blättern mittels Karborundum mit dem nekrotischen Stamm *S* des Virus *X* beimpft. Dieser Stamm mehrmals auf *Datura stramonium* verimpft, blich in unseren Kulturen viele Jahre hindurch unverändert.

Alle 4 bis 5 Tage vom Datum der Infizierung gerechnet wurde im Brei der infizierten Blätter das totale Amino — N, mittels der Van-Slyke Methode bestimmt. Die Amino — N Menge wurde im Blätterbrei in mg im Verhältnis zu 1 g trockener Substanz bestimmt. Abbildung 6 stellt die Amino-N Menge in den beimpften, mit nekrotischen Primärherden des Virus *X* behafteten Blättern und in den aufeinanderfolgenden mit Sekundärsymptomen behafteten Blättern dar.

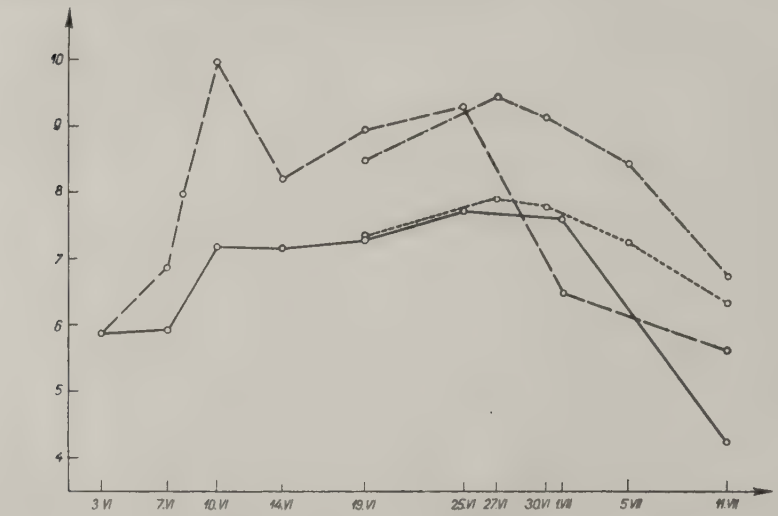


Abb. 6. Amino N in gesunden und mit Virus *X* behafteten Tabakblättern

Rys. 6. Azot aminowy w zdrowych i zarażonych mozaiką tytoniową liściach tytoniowych

Auf Tabelle I ist die intensität der Präzipitinreaktion der Säfte der mit Virus *X* Immunseren untersuchten Blätter zusammengestellt.

Ähnliche Änderungen des Virusgehaltes in Tabakblättern während der ersten Vegetationsperiode fand B e r c k s (1954) und P a u l (1957).

Am zweiten, fünften und siebenten Tage nach der Infizierung, wurden Konduktogramme mit den Säften gesunder und mit X^s infizierten Blätter ausgeführt. In den Säften wurden vor der Titrierung die Proteine durch Kochen ausgefällt. Am zweiten Tage beobachtete man keine Krankheitssymptome auf den Blättern. Am fünften Tage erblickte man, aber nur im U.V.-Licht, die Primärherde, 22 an Zahl, im Verhältnis zu 100 cm^2

Tabelle I

Die Präcipitinreaktion mit Virus X Immunserum

Odczyn precypitacji z surowicą anty-virus X

A. Erste Blätter mit nekrotischen Primärherden

Pierwsze liście z pierwotnymi plamkami nekrotycznymi

Untersuch. Datum Data badania	Tage n. d. Infektion Dni po zakażeniu	Grösse der Blätter Wielkość liścia cm	Verdünnung des Serums Rozcieńczenie surowicy							
			1:2	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
5. V.	0	3 × 2	—	—	—	—	—	—	—	—
8. V.	3	3.5 × 2,2	—	—	—	—	—	—	—	—
15. V.	7	10 × 5,5	+	—	—	—	—	—	—	—
21. V.	13	12 × 7	+++	++	±	—	—	—	—	—
28. V.	20	16 × 9,5	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
30. V.	22	20 × 11	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
11. VI.	34	16 × 11	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	—

B. Blätter mit sekundären Symptome (fünftes und sechstes Blatt)

Liście z wtórnymi objawami (piąty i szósty liść)

22. V.	14	13 × 7,5	+++	++	—	—	—	—	—	—
30. V.	22	20 × 11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
7. VI.	28	20 × 10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
19. VI.	40	21 × 10	+++	+++	+++	+++	+++	+	—	—

Blätterfläche. Die Präzipitinreaktion des unverdünnten Saftes mit dem Virus *X* Immunserum ausgeführt, war schwach sichtbar. Die mit den Säften der obigen Blätter ausgeführten Konduktogramme, so wie die Konduktogramme gesunder Blätter wiesen vier Segmente auf (Abb. 1 und 7).

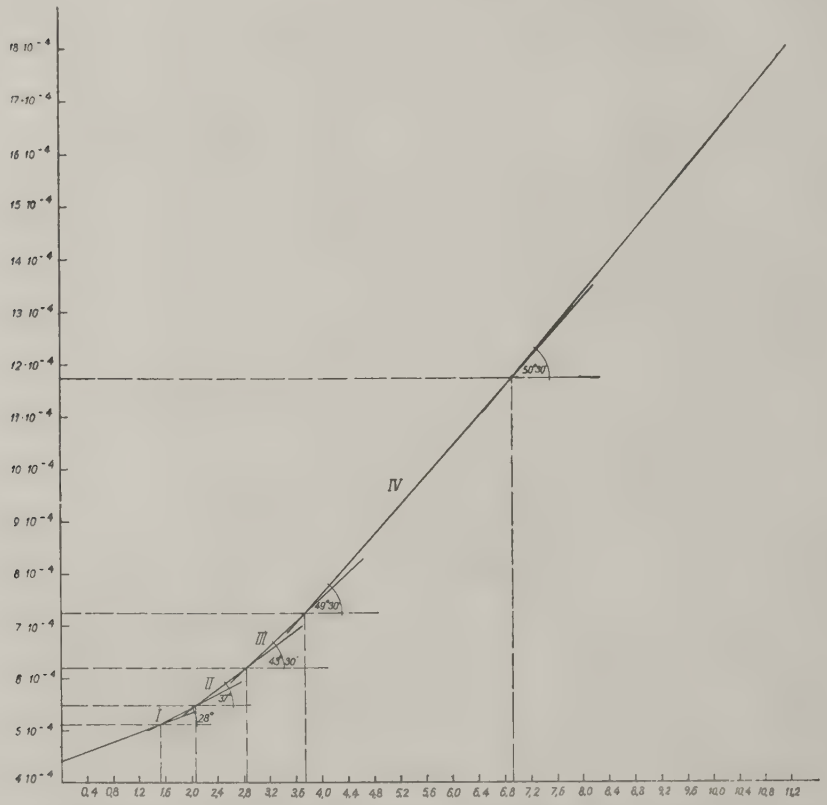


Abb. 7. Konduktogramm der Tabakblätter am fünften Tag nach Infizierung mit Virus *X*

Rys. 7. Konduktogram soku z liści tytoniu na piąty dzień po zakażeniu wirusem *X*

Am siebenten Tage nach der Infizierung wuchs die Zahl der mit bloßem Auge sichtbaren Primärherde auf, 148 im Verhältnis zu 100 cm^2 Blattfläche. Die Präzipitinreaktion war deutlich. Das mit dem Safte dieser Blätter ausgeführte Konduktogramm wies 5 Segmente auf. Es wurde festgestellt, daß das fünfte Segment, welches am siebenten Tage auftrat, der Asparaginsäure entsprach (Abb. 8).

Wie aus den beigefügten Abbildung 6 ersichtlich ist, tritt die höhste N-Aminomenge am siebenten Tage der Infizierung auf.

Bei der Anwendung der Papierchromatographie wurden in gesunden Tabakblättern 6 freie Aminosäuren festgestellt, nämlich: Tyrosin, Pro-

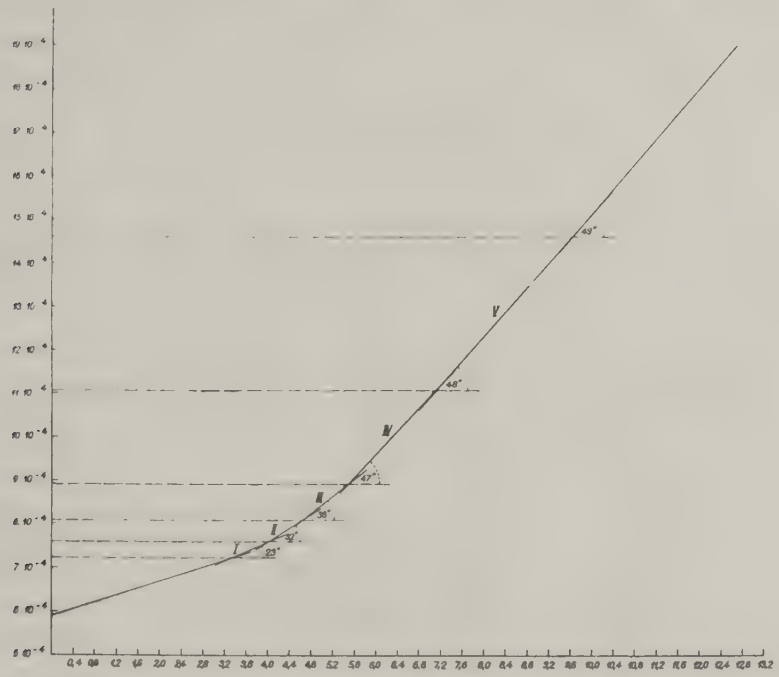


Abb. 8. Konduktogramm der Tabakblätter am siebenten Tag nach Infizierung mit Virus X

Rys. 8. Konduktogram soku z liści tytoniu na siódmy dzień po zakażeniu wirusem X

lin, Alain, Glutamin, Asparaginsäure und Serin (L a l o r a y a, 1955). In 5 ml des von uns konduktometrisch am zweiten Tage, untersuchten Tabaksaftes, wurden mittels Van-Slykes Methode 4,97 mg Amino-N bestimmt. Im Konduktogramm traten jedoch keine der oben erwähnten Aminosäuren auf.

Am fünften Tage nach der Infizierung wuchs in 5 ml Tabaksaft das Amino-N bis auf 5,45 mg. Im Konduktogramm jedoch traten auch weiter keine von den oben erwähnten Aminosäuren auf. Am siebenten Tage betrung die N Aminomenge in 5 ml Tabaksaft 6,71 mg, sie war also um 1,74 mg großer als im Saft gesunder Blätter. Gleichzeitig trat im Kon-

duktogramm ein fünftes Segment auf, welches der Asparaginsäure entsprach. Es mußte also noch festgestellt werden, ob der ganze Überschuß der freien Aminosäuren in den mit dem Virus *X* infizierten Blättern, der im Konduktogramm entdeckten Asparaginsäure entsprach.

Zu 5 ml Saft von gesunden Tabakblättern setzte man der Reihe nach immer kleinere Dosen 0,1 N Kaliumasparaginat zu und führte jedesmal ein Konduktogramm aus. Im Falle, wenn zu 5 ml Saft 0,5 ml, 0,4 ml, 0,3 ml und 0,2 ml 0,1 N Kaliumasparaginat zugesetzt wurden, erschien in allen Fällen auf der Titrierkurve ein fünftes Segment auf. Es entsprach dem hinzugefügten Kaliumasparaginat. Erst als zu 5 ml Saft 0,1 ml 0,1 N Kaliumasparaginat hinzugefügt wurde, trat auf der Titrierkurve kein Segment auf.

0,1 ml einer Kaliumasparaginatlösung entspricht 1,046 mg, 0,2 ml entsprechen 2,092 mg Kaliumasparaginat. 2,092 mg Kaliumasparaginat enthalten 0,014 mg Amino-N. Es ist dies die Menge, die in Gestalt eines Segments auf der Titrierkurve erscheint.

Am fünften Tage nach der Infizierung nahm die Menge des mit der Van-Slyke Methode bestimmten Amino-N in 5 ml Tabaksaft um 0,48 mg zu. Bei dieser Menge von Amino-N trat kein Segment auf, das der Asparaginsäure entsprechen würde. Die Bereicherung an Amino-N am fünften Tage nach der Infizierung entsprach also nicht einer, sondern mehreren Aminosäuren.

Am siebenten Tage nach der Infizierung stieg in 5 ml Tabaksaft das Amino-N um 1,74 mg, gleichzeitig erschien auf der Titrierkurve ein neues Segment das der Asparaginsäure entsprach. Das Auftreten eines neuen Segments auf dem Konduktogramm bewies in diesem Fall, daß im Vergleich zu anderen Aminosäuren, die Asparaginsäure in infizierten Tabakblättern sich am meisten bereicherte.

ZUSAMMENFASSUNG

Die klaren Tabaksäfte, mit H_2O 1 : 50 verdünnt, titrierte man konduktometrisch mittels 0,1 N HCl.

Die Konduktogramme wiesen 5 Brechpunkte denen 4 Segmente auf der Titrierkurve entsprachen. Diese Segmente entsprachen den durch HCl aus den Salzen verdrängten Säuren, nämlich: der Phosphor-, Zitronen-, Apfelsäule und $KHSO_4$. Das Verdrängen der einzelnen Säuren hängt von deren Dissoziationskonstanten ab, und zwar von dem niedrigsten, ersten Dissoziationsgrad der Apfelsäure bis zum zweiten höchsten Dissoziationsgrad der Schwefelsäure.

Die mit dem Virus *X* (Stamm *S*) infizierten Tabakblätter zeigten eine Erhöhung der totalen Amino-N Menge, welche mittels der Van-Slyke

Methode im Brei bestimmt wurde. Der höchste N-Amino-Gehalt tritt am siebenten Tag nach der Infizierung auf, als die Primärherde auf den Blättern mit bloßem Auge sichtbar waren und Präzipitinreaktion deutlich war. Gleichzeitig trat im Konduktogramm ein fünftes Segment auf, welches der Asparaginsäure entsprach.

Die in großer Menge gleichzeitig mit dem Virusprotein auftretende Asparaginsäure, entsprach nicht gänzlich dem Überschuß des Amino-N in den kranken Tabakblättern.

LITERATURVERZEICHNIS

Bercks R., 1954: Untersuchungen über Änderung des Virusgehältes in Tabakpflanzen während der Vegetationsperiode. *Phytopath.* **22** : 215.

Commoner Bary, Varta Nehav, 1953: *J. Gen. Physiol.*, **36** : 79.

Kozłowska A., 1957: Detection of Salts in Plant Juices by Conductometric Methods. *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **5** : 115.

Kozłowska A., Wyczałkowska W., 1956: Physico-Chemical Properties of Plants Saps Investigated by Conductometrical Methods. *Bull. Acad. Polon. Cl II*, **4** : 211.

Laroraya M. M., 1955a: Effect of Yellow Mosaic Virus on the free aminoacid and organic acid of *Phaseolus vulgaris* L. leaves. *Naturwissenschaften*, **42** : 489.

Laloraya M. M., Govind J., 1955b: Effect of Tabacco-Curl and Tobacco Mozaic Virus on the Amino-Acid and Amide-Contents of *Nicotiana sp. Nature*, **175** : 907.

Meneghini M., Delwiche C. C., 1951: The multiplication of tobacco mozaic virus in the host tobacco plant. *J. Biol. Chem.*, **189** : 177.

Mortus L. F., Balls A. K., Mc Konney H. H., 1951: *Science*, **87** : 177.

Paul H. L., 1957: Spectrophotometrische Untersuchungen über die Virusvermehrung in Tabak. *Phytopath. Z.*, **28** : 307.

Rajarao T., Laroaya M. M., Govind J., 1956: Absence of some free aminoacids from the diseased leaves of *Trichosanthes anguinea*. *Naturwissenschaften*, **43** : 301.

Vickery H. B., Pucher G. W., Schoenheimer R., Rottenberg D., 1940: The assimilation of ammonia nitrogen by the tobacco plant. *Biol. Chem.*, **135**.

A. Kozłowska

WYKRYWANIE WIRUSA X W LIŚCIACH TYTONIU METODĄ KONDUKTOMETRYCZNĄ

Streszczenie

Konduktogramy otrzymane miareczkowaniem kwasem solnym rozcieńczonych soków roślinnych wykazują na skutek załamania krzywej miareczkowania szereg odcinków, które odpowiadają poszczególnym nieorganicznym i organicznym kwasom, wypartym przez HCl z odpowiednich, znajdujących się w sokach soli.

Ogólna kwasowość soków młodocianych liści tytoniu, określona konduktometrycznie, miareczkowaniem LiOH, odpowiada w pierwszym rzędzie drugiej i trzeciej stałej dysocjacji znajdujących się w soku kwaśnych fosforanów, cytrynianów i jabłczanów.

Konduktogramy otrzymane miareczkowaniem HCl soków młodocianych liści tytoniu wykazują na krzywej miareczkowania 5 punktów załamania, tworzących 4 odcinki. Odcinki te odpowiadają kwasom: fosforowemu, cytrynowemu, jabłkowemu oraz kwaśnemu siarczanowi potasu. Wypieranie przez HCl kwasów z odpowiadających im soli odbywa się selektywnie zależnie od ich stałych dysocjacji: od najniższej stałej dysocjacji kwasu jabłkowego do najwyższej drugiej stałej dysocjacji kwasu siarkowego.

Porażone wirusem X^S liście tytoniu wykazały w porównaniu z liśćmi zdrowymi większą ilość wolnych aminokwasów w wyciśniętym soku. Największe nagromadzenie wolnych aminokwasów przypada siódmego dnia od momentu zakażenia, gdy plamki nekrotyczne są już gołym okiem widoczne, a próba serologiczna precypitacji daje z surowicą anty-wirus X pozytywną reakcję. Jednocześnie na konduktogramie zjawia się piąty odcinek odpowiadający kwasowi asparaginowemu.

Ujawnienie się kwasu asparaginowego pod postacią nowego odcinka na konduktogramie wskazuje, że w czasie syntezy białka wirusowego, w porównaniu z innymi aminokwasami, kwas asparaginowy przybywa w największej ilości.

Pani mgr Marii Wróblównie składam serdeczne podziękowanie za wykonanie konduktogramów, Komitetowi Mikrobiologicznemu PAN za pomoc finansową umożliwiającą przeprowadzenie analiz, mgrowi W. Komusińskiemu za oznaczenie N-aminowego metodą Van Slyka.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 65-72

K. Kamieńska-Żyła

WYKRYWANIE WIRUSA X W LIŚCIACH TYTONIU METODĄ ELEKTROFOREZY BIBUŁOWEJ

Z Pracowni Wirusologicznej Zakładu Fizjologii
Roślin Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

Wpłynęło dnia 15 lipca 1957 r.

STAN DOTYCHCZASOWYCH BADAŃ

Dotychczasowe badania nad zawartością białek w soku wyciśniętym z chorych liści tytoniu, przeprowadzone metodą elektroforezy, dotyczyły przede wszystkim wirusa mozaiki tytoniowej.

Frampton i Takahashi (1944) wykazali przy pomocy elektroforezy, stosując metodę Tiseliusa, że w liściach tytoniu po zakażeniu wirusem mozaiki tytoniowej (*T. M. V.*) pojawia się nowe białko, nieobecne w liściach zdrowych.

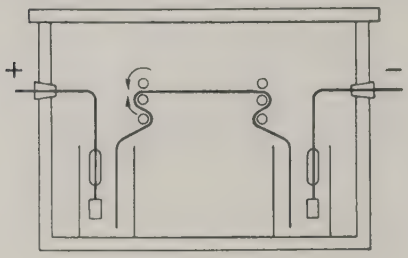
Wildman, Cheo i Bommer (1949) stwierdzili, również przy zastosowaniu tej samej metody, pojawianie się nowego białka w liściach tytoniu w trzy dni po ich zakażeniu wirusem mozaiki tytoniowej.

Gray (1952), stosując po raz pierwszy metodę elektroforezy bibułowej, zaproponowaną przez Durrum (1950), wykazał, że w liściach tytoniu w tydzień, a z reguły w dwa tygodnie po zakażeniu mozaiką tytoniową pojawiają się na bibule trzy plamy odpowiadające trzem substancjom białkowym. W zdrowych liściach natomiast występują tylko dwie plamy. Autorzy wymienionych prac brali do badania sok roślinny oczyszczany. Był on po wyciśnięciu z liści poddawany różnym zabiegom: mrożony, dializowany, wielokrotnie wirowany itd. Zadaniem niniejszej pracy było wykrycie obecności białka wirusa przy pomocy elektroforezy bibułowej w świeżym soku, wyciśniętym z liści tytoniu bez poddawania go jakimkolwiek zabiegom oczyszczającym.

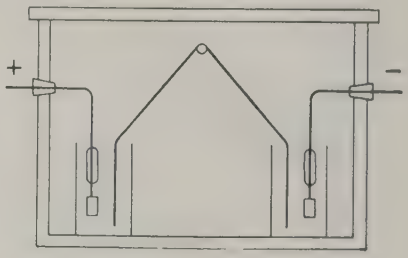
ZESTAW APARATURY UŻYTEJ DO ELEKTROFOREZY BIBUŁOWEJ

Elektroforezę przeprowadzano na paskach bibuły Whatman Nr 1 o długości 29-32 cm i szerokości 2 cm. Zastosowano dwie metody umocowania pasków:

w pierwszym wypadku paski przeciągano pomiędzy trzema pręcikami kwarcowymi położonymi jeden nad drugim z dwóch stron napiętego paska. Pręciki obracały się przy pomocy bębenków, co ułatwiało napięcie paska (ryc. 1). Ponadto pręciki były umieszczone na stojaku o czterech wysuwanych nóżkach, pozwalających na wydłużanie bądź skracanie paska.



Rys. 1. — Fig. 1.



Rys. 2. — Fig. 2.

Rys. 1. Sposób umocowywania pasków bibuły na trzech pręcikach kwarcowych
Rys. 2. Sposób umocowywania pasków bibuły metodą Durrum

Fig. 1. Paper electropphoresis of proteins. Attachment of paper bands by means of three quartz rods
Fig. 2. Attachement of paper bands according to Durrum

W drugim wypadku, zgodnie z metodą Durrum (1950), pasek bibuły zawieszano na jednym pręciku kwarcowym tak, że końce bibuły zwisały ukośnie do naczyń z płynem buforowym (rys. 2).

Użycie pręcików kwarcowych do elektroforezy bibułowej jest konieczne, gdyż — jak wykazały prace Kamieńskiego (1955) — pręciki szklane zmieniają koncentrację jonów wodorowych w wilgotnej bibule o dwie jednostki w kierunku alkalicznym (np. z *pH* 6,5 do *pH* 8,5). W wypadku, gdy bibuła jest zwilżona buforem, zmiana dochodzi łatwo do 1/2 lub jednostki *pH*. Pręciki kwarcowe nie wywołują natomiast w wilgotnej bibule żadnej zmiany *pH*. Końce pasków bibuły zwisające z kwarcowych pręcików zanurzono w naczyńkach elektrodowych, wypełnionych płynem buforowym, o *pH* 8,6.

W skład zastosowanego buforu wchodził: dwuetylobarbituran sodu, cytrynian sodu i kwas cytrynowy, połączenie buforowe uznane jako najlepsze przy rozdziale elektroforetycznym białek (Gray 1952, Hais i Maček, 1954).

W naczyńkach o pojemności 100 ml (25 ml płynu buforowego w każdym) umieszczano elektrody platynowe zasilane prądem z prostownika.

Cały aparat umieszczano w komorze szklanej w kształcie prostopadłościanu o długości 20 cm, szerokości 15,5 cm i wysokości 14 cm. Komora była przykryta płytką szklaną.

MATERIAŁ ROŚLINNY

Przedmiotem badania były młodociane liście tytoniu *Nicotiana tabacum* odmiana White Burley, zdrowe i porażone wirusem ziemniaczanym. Rośliny pochodziły z hodowli szklarniowych w okresie od marca do września. Poddawane szczepieniu siewki tytoniu miały rozwinięte 4-5 listków

młodocianych. Szczepienia dokonywano metodą inokulacji przy użyciu karborundu jako materiału ściernego, powodującego zranienie tkanki.

Do szczepienia używano silnie wirulentny szczep *S* wirusa *X*. Szczep ten pochodził z ziemniaków uprawianych pod Krakowem. Ponieważ występował on na ziemniakach wraz z wirusem *Y*, przeprowadzono go najpierw przez *Datura stramonium*, roślinę niewrażliwą na wirus *Y*, a następnie w czystej formie przeszczepiono na siewki tytoniu. Użyty przez nas do doświadczeń materiał przez szereg lat z rzędu utrzymywał się na tytoniu w czystej formie (Kozłowska, Dwuraźna i Maj, 1956).

Zakażone szczepem *X* siewki tytoniu już po 4-6 dniach wykazywały na liściach szczepionych pierwsze objawy zakażenia w formie małych plamek nekrotycznych, tzw. local lesions. W dwa tygodnie od momentu zaszczepienia na rozwijających się następnie nieszczepionych liściach występowały objawy wtórne w postaci silnej mozaiki z nekrotycznymi plamkami na całej powierzchni liścia. Do badania elektroforetycznego brano zawsze liście z wyraźnymi objawami wtórnymi. Sok wyciśnięty z liści dawał z surowicą antywirus *X* w rozcieńczeniu 1 : 320 wyraźną precypitację.

SPOSÓB POSTĘPOWANIA I UZYSKANE WYNIKI

Liście tytoniu z wyraźnymi objawami zakażenia zaraz po zerwaniu rozcierano w moździerzyku porcelanowym przez 1-2 minut. Z kilku ml otrzymanego soku pobierano do badania elektroforetycznego mikropipetą około 0,004 ml. Sok natychmiast po wyciśnięciu nakładano dokładnie na środek paska bibuły zwilżonej buforem.

Prąd przepuszczano przeciętnie przez 2 godziny, po czym pasek bibuły zdejmowano i suszono w temperaturze 105°. Jeżeli elektroforeza trwała dłużej niż 2 godziny, poszczególne strefy rozdzielonych białek rozmazywały się i zachodziły na siebie na skutek zbyt silnego nagrzewania się paska. Stosowano napięcie od 190 do 200 wolt, a natężenia od 0,7 (początkowe) do 1,5 (końcowe) mA. Napięcie na 1 cm długości paska — 6,5 wolt.

Do suszenia pasków używano specjalnie do tego celu skonstruowanego aparatu. Zwyczajną żarówkę o mocy 150 watów umieszczano na stojaku, przykrywano folią glinową i wysokim kloszem szklanym. Klosz posiadał od góry wąski otwór, przez który wkładano paski bibuły. Otwór w kloszu był zasłonięty azbestową pokrywką z otworkiem na termometr. Paski bibuły zawieszano obydwoma końcami na górnej krawędzi klosza, a środek paska, na którym nastąpił rozdział substancji białkowych soku, znajdował się w kloszu, gdzie suszył się przez 15 minut pod wpływem promieniującego ciepła żarówki. Przy zastosowaniu takiego sposobu otrzymuje się bardzo szybko żądaną temperaturę. Dla otrzymania barwnej substancji białkowej rozdzielanej elektroforetycznie na bibule zastosowano trzy następujące metody:

METODA I — NINHYDRYNA

Wysuszone paski napylano równomiernie roztworem ninhydryny, zawierającym 0,2% ninhydryny rozpuszczonej w 96-procentowym alkoholu etylowym (Hais i Maček, 1954). W celu uzyskania jednostajnego ciśnienia używano specjalnego balonika, który nadymano do określonej objętości, po czym wypuszczano prąd powietrza z balonika do rozpylacza uzyskując jednolite zwilżenie paska bibuły roztworem ninhydryny. Następnie pasek suszono w temperaturze 105°. Ninhydryna w temperaturze około 100° daje barwne połączenia zarówno z białkiem, jak i aminokwasami. Ponieważ w obrazie na elektroforogramach nie otrzymano różnicy pomiędzy zdrowymi i chorymi liśćmi tytoniu, zaczęto używać do wywoływania pasków błękitu bromofenolowego i czerni amidowej 10B, które dały wyniki pozytywne.

METODA II — BŁĘKIT BROMOFENOLOWY

Po wysuszeniu umieszczano paski bibuły na okres 5 minut w wanience napełnionej roztworem błękitu bromofenolowego (0,05% błękitu bromofenolowego + 1% $HgCl_2$ rozpuszczone w 96-procentowym alkoholu etylowym (Hais i Maček, 1954). Następnie odbarwiano paski bibuły, kąpiąc je w około 0,5-procentowym kwasie octowym do chwili zniknięcia z bibuły niebieskiego tła. Odbarwione paski trzymano przez 1 sekundę nad parowniczką ze stężonym NH_4OH w celu wywołania niebieskiej barwy, charakterystycznej dla białek. Potem suszono bibułę w suszarce.

METODA III — CZERŃ AMIDOWA

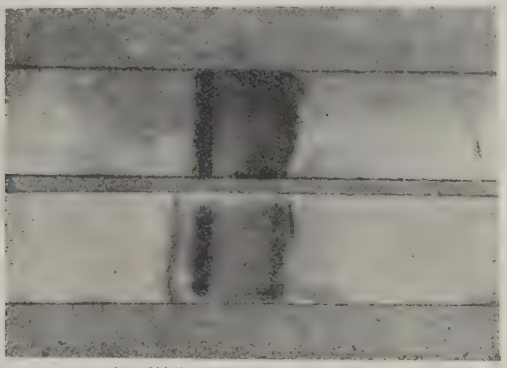
Do wywoływania rozdzielonych elektroforetycznie białek używano również czerni amidowej 10B. Paski bibuły barwiono przez zanurzenie w kąpieli o składzie: nasycony roztwór czerni amidowej w alkoholu metylowym i 10-procentowy kwas octowy (Grassman, Hannig, 1953). Powstające na bibule niebieskie tło odbarwiało się w alkoholu metylowym z 10-procentowym kwasem octowym. Paski suszono na wolnym powietrzu.

Z trzech zastosowanych metod dwie ostatnie dały identyczne, powtarzające się wyniki.

WYNIKI

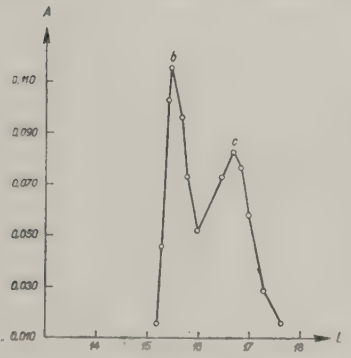
Elektroforogram soku z liścia zdrowego wywołany błękitem bromofenolowym przedstawiał się następująco (rys. 3): na pasku bibuły otrzymano dwa pasma: jedno barwy zielononiebieskiej, drugie w kolorze indyga. Pasmo zielononiebieskie nie wędrowało pod wpływem prądu elektrycznego pozostając w miejscu nałożenia badanego soku. Według Wildmana i Jagendorfa (1952) chloroplasty absorbują od 35 do 45% białka w liściach. Ponieważ zielone pasmo na bibule barwiło się pod wpływem błękitu bromofenolowego na kolor niebieskawy, należy przypuszczać, że zaabsorbowane przez chloroplasty białko pozostało w tym miejscu na bibule. Otrzymane na bibule pasmo odpowiadało tym samym chlorofilowi związanemu częściowo z białkiem. Drugie pasmo o kolorze indyga wędrowało pod wpływem prądu elektrycznego w kierunku anody; odpowiadało ono prawdopodobnie substancjom białkowym nie związanym z chloroplastami.

Elektroforogram soku z liści porażonych wirusem *X* wywołany błękitem bromofenolowym przedstawiał odmienny obraz (rys. 3). Wystąpiły wyraźnie trzy pasma. Dwa z nich odpowiadały opisanym na elektrofo-



Rys. 3. Elektroforogramy soku liścia tytoniowego zdrowego (górny pasek) i porażonego wirusem *X* (dolny pasek).

Fig. 3. Electrophorograms of leaf sap of healthy tobacco plant (the upper band) and of that infected with virus *X* (the lower band).

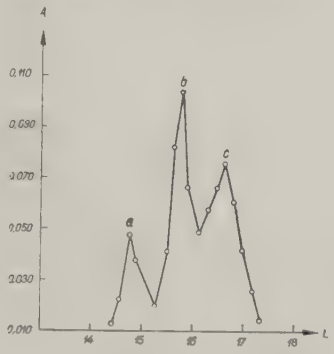


Rys. 4. Współczynnik absorpcji światła elektroforogramu soku liścia tytoniowego zdrowego

Fig. 4. The absorption coefficient on electrophorogram of the sap from healthy tobacco leaf

b) chlorofil z adsorbowanym białkiem, c) substancje białkowe nie związane z chloroplastami tkanki liściowej

b) chlorophyll with adsorbed protein substances, c) protein substances of the leaf tissue not adsorbed by chloroplasts.



Rys. 5. Współczynnik absorpcji światła chloroforogramu soku liścia tytoniu porażonego wirusem *X*

Fig. 5. The absorption coefficient of the electrophorogram of the sap from tobacco leaf infected with Virus *X*

a) białko wirusowe, b) chlorofil z adsorbowanym białkiem, c) substancje białkowe nie związane z chloroplastami tkanki liściowej

a) Virus-protein, b) chlorophyll with adsorbed protein substances, c) protein substances of the leaf tissue not adsorbed by chloroplasts

rogramie z liści zdrowych, trzecie pasmo wystąpiło ± 1/2 cm od miejsca nałożenia soku na bibule w kierunku katody.

Na stu przebadanych zdrowych i porażonych wirusem liściach tytoniu wystąpiła opisana charakterystyczna różnica w elektroforogramach. Z dużym prawdopodobieństwem można przeto przyjąć, że trzecie wędrujące ku katodzie pasmo odpowiada białku wirusowemu. Intensywność zabarwienia substancji białkowych soku liści tytoniu odczytywano na paskach bibuły fotometrycznie. Pasek bibuły przesuwano na szynie przed oświetloną szczeliną o szerokości 1 mm, a długości 2 cm. Natężenie światła przechodzącego przez pasek oznaczano przy pomocy fotokomórki selenowej. Zmiany natężenia prądu fotoogniwa zapisywano na kartce papieru. Przy odczytywaniu pasków stosowano pomarańczowy filtr uzupełniający, ponieważ po wywołaniu błękitem bromofenolowym otrzymywano obrazy o kolorze indyga.

Rysunek 4 i 5 przedstawia wykresy odczytane fotometrycznie dla liścia zdrowego i porażonego wirusem. Na osi rzędnych zaznaczono wartości współczynnika adsorpcji, a na osi odciętych odległości od początku paska.

Pragnę w tym miejscu dać wyraz głębokiej wdzięczności Pani prof. dr Anieli Kozłowskiej, która zaproponowała mi temat pracy i udzielała cennych rad i wskazówek w czasie jej wykonywania.

LITERATURA

Durrum L., 1950: *J. Am. Chem. Soc.* **72**: 2943.
Frampton V. L., Takahaski W. N., 1944: *Arch. Bioch.* **4**: 249.
Grassmann W., Hannig K., 1953: *Z. physiol. Chemie*, **292**: 32.
Gray A., 1952: *Arch. Bioch. and Bioph.* **38**: 305.
Hais J., Maček K., 1954: „Papirowa chromatografie", Nakladatelstvi Ceskoslovenski Akademie Ved, Praha.
Kamieński B., 1955: Zakład Chemii Fizycznej UJ (na podstawie ustnej informacji).
Kozłowska A., Dwurażna M., Maj Z., 1956: *Rocz. Nauk. Roln., D*, 77. Monografia.
Wildman S., Chec C. C., Bommer J., 1949: *J. Biol. Chem.* **180**: 985.
Wildman S., Jagendorf A., 1952: *Ann. Rev. Plant Phys.*, **3**: 131.

K. Kamieńska-Żyła

DETERMINATION OF THE VIRUS *X*-PROTEIN IN TOBACCO LEAVES BY MEANS OF PAPER ELECTROPHORESIS

Summary

1) In the research here reported, the method of paper electrophoresis was applied to separate the protein substances contained in the sap of healthy tobacco laeves and of those infected with potatoe Virus *X*.

2) The protein substances contained in fresh tobacco leaf sap were separated electrophoretically, without previously subjecting the sap to any purifying procedures whatsoever.

3) The electrophorograms of sap from healthy young tobacco laeves exhibited, after developing either with bromophenol blue or amide black, one band remaining in the place where the sap composed of chlorophyll with absorbed protein had been placed, and a second band of protein substances shifted ± 1 cm towards the anode.

4) The electrophorograms of sap from tobacco laeves infected with Virus *X* shoved, after developing, three coloured bands, of which two corresponded to those proviously described in healthy laeves; the third, probably being formed by the virus protein, was shifted ± 1 cm towards the cathode.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 73-82

KRONIKA

Z DZIAŁALNOŚCI ODDZIAŁÓW POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW *

Oddział w Krakowie

1 października 1957 r.:

I. Rybarska (Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Krakowie): „Metody badania żywotności prątków gruźlicy".

Sposoby badania żywotności prątków gruźlicy i *BCG* podzielono na trzy grupy: metody hodowlane, biochemiczne oraz przyżyciowego barwienia.

Podano zasady i omówiono możliwości błędów oznaczania żywotności prątków gruźlicy i *BCG* klasyczną metodą hodowlaną w mikrobiologii (metoda szkiełkowa).

Przedstawiono metody określania żywotności prątków gruźlicy i *BCG* pomiarami zużycia tlenu w aparacie Warburga przy pomocy oznaczania katalazy oraz C radioaktywnego. Z metod redukcyjnych omówiono odczyn tellurynowy, redukcji azotanów, błękitu metylenowego, chlorku 2,3,5-trójfenylotetrazolu, Fe III w kompleksowym połączeniu z kwasem etyleno-dwuamino-esteroctowym.

Z metod przyżyciowego barwienia podano sposób różnicowania żywych i martwych prątków gruźlicy i *BCG* w mikroskopie fluorescensyjnym przy użyciu oranżu akrydynowego oraz rodamino-auraminy.

Badania Przybyłkiewicza i Rybarskiej miały na celu opracowanie szybkiego i prostego sposobu oznaczania żywotności prątków *BCG* w szczepionce. Autorzy zastosowali metodę Lacka, pozwalającą na różnicowe barwienie się żywych oraz martwych prątków gruźlicy przy pomocy zieleni malachitowej i safraniny. Badanie przeprowadzono na 100 ampułkach 50 serii liofilizowanych oraz 20 flaszeczkach z 10 serii płynnej szczepionki *BCG*. Według opracowanego przez autorów sposobu ilościowego oznaczania żywych i martwych prątków w szczepionce *BCG* uzyskano następujące wartości (średnie arytmetyczne): 22.3×10^6 żywych oraz 6.3×10^6 martwych prątków na 1 mg masy bakteryjnej w szczepionce *BCG* liofilizowanej. Wyniki otrzymane tą metodą są bardziej stałe i obarczone mniejszym błędem niż wyniki metody hodowlanej.

J. Bóbr, J. Guzek, Z. Mach i R. Rembiera (Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Zakład Patologii Akademii Medycznej w Krakowie): „Zachowanie się układu dokrewnego w tężcu doświadczalnym", 1. Tarczyca.

* Zgodnie z życzeniem Zarządu Głównego PTM oraz Rady Redakcyjnej *Acta Microbiologica Polonica* Redakcja przystępuje do publikacji krótkich sprawozdań z posiedzeń naukowych Oddziałów Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

Świnkom morskim podano domięśniowo toksynę tężcową w ilości 0,66 γ/kg wagi ciała. Rozwijał się pełny obraz tężca doświadczalnego, prowadzący do śmierci w siódmym dniu choroby. Od 5 zwierząt zabitych w szóstym dniu choroby pobrano tarczycę do badań chemicznych i histologicznych. Oznaczono zawartość jodu całkowitego w tarczycy zwierząt obciążanych i nie obciążanych KJ zmodyfikowaną metodą Fellenberga. Do oceny histologicznej zastosowano kariometrię oraz pomiary wysokości nabłonka pęcherzyków tarczycy. Nie stwierdzono żadnych różnic ani w przemianie jodowej, ani w obrazie histologicznym gruczołu tarczowego w porównaniu ze zwierzętami prawidłowymi.

12 października 1957 r.:

Zofia Sembrat-Niewiadomska (Krakowska Wytwórnia Surowic i Szczepionek): Sprawozdanie z III Międzynarodowego Zjazdu Standaryzacji Preparatów Biologicznych w Opatji (Jugosławia), 2-6 września, 1957 r.

W dniach od 2 do 6 września 1957 r. odbył się w Opatji (Jugosławia) III Międzynarodowy Zjazd poświęcony zagadnieniom standaryzacji preparatów biologicznych, a w szczególności surowic i szczepionek. Udział w Zjeździe wzięło ponad 240 delegatów, reprezentujących 33 państwa obu półkul, delegat Światowej Organizacji Służby Zdrowia dr N. K. Jerne oraz generalny sekretarz Międzynarodowego Towarzystwa Mikrobiologów prof. G. Penso. Z Polski wyjechało trzech delegatów reprezentujących PZH oraz Lubelską i Krakowską Wytwórnię Surowic i Szczepionek i delegat reprezentujący weterynaryjną służbę zdrowia. Uczestnikami Zjazdu byli przedstawiciele zakładów produkcyjnych prywatnych i państwowych, przedstawiciele zakładów wykonujących kontrolę oraz zakładów mikrobiologicznych zajmujących się teoretycznie zagadnieniami technologii.

Zjazd obradował na plenarnych posiedzeniach i w komisjach tzw. roboczych, poświęconych poszczególnym zagadnieniom. Na zakończenie Zjazdu podjęto szereg uchwał, które wyłoniły się z referatów i dyskusji.

I Komisja zajmowała się zagadnieniem stosowania hodowli tkankowych *in vitro* w kontroli surowic i szczepionek, w oznaczaniu wartości toksyn i antytoksyn. Tymczasowe wyniki prac dotyczyły toksyny błoniczej, zgorzeli gazowej, gronkowcowej i paciorkowcowej.

II Komisja, dotycząca zagadnień grypy, podkreślała znaczenie czynnego uodparniania w zapobieganiu grypie przez stosowanie szczepionek żywych lub zabitych. Szczególnie zwrócono uwagę na metodę polegającą na wprowadzaniu do dróg oddechowych polywalentnej surowicy końskiej odpornościowej. Metoda ta, na szeroką skalę przekontrolowana w Związku Radzieckim, jest bardzo obiecująca zarówno w zapobieganiu, jak i w leczeniu grypy.

III Komisja pracowała nad zagadnieniem szczepionek skojarzonych, a w szczególności zaś nad zapoczątkowaniem i prowadzeniem badań nad następującymi szczepionkami skojarzonymi: a) tężec — błonica — krztusiec, b) tężec — dur brzuszny, c) tężec — błonica, d) tężec — błonica — krztusiec — czerwonka.

IV Komisja obradowała nad oceną wartości szczepionki brucelowej, szczególnie ważnej w medycynie weterynaryjnej.

V Komisja omawiała metody badań gwarantujących jałowość surowic i szczepionek, zalecając przeprowadzenie badań z podłożami dla hodowli specjalnie wybrednych, inkubowanych nie tylko w temperaturze 37°, lecz również niższych i wyższych, dla wykrycia obecności drobnoustrojów kryo- lub termofilnych. Sugeruje się co najmniej 10-dniowy okres inkubacji.

VI Komisja, obradująca nad zagadnieniem duru brzusznego, zaleca dalsze przeprowadzanie badań nad przygotowaniem szczepionek przeciw durowi brzusznemu — szczepionek składających się z całych komórek bakteryjnych, szczepionek płynnych i suchych, adsorbowanych i nieadsorbowanych lub też składających się z pewnych frakcji antygenowych. Badania te powinne być potwierdzone przez wyniki otrzymywane z terenu dzięki nowym kampaniom szczepień wykonywanych kilkoma typami szczepionek, przy dokładnej kontroli wyników.

Ogólnym zaleceniem dla wszystkich laboratoriów jest zachęta do stałej wymiany odpowiednich wzorców (surowic, toksyn, zawiesin itp.), aby doprowadzić do ujednolicenia preparatów w skali międzynarodowej.

Ogólnym zaleceniem dla wszystkich laboratoriów jest zachęta do stałej wymiany odpowiednich wzorców (surowic, toksyn, zawiesin itp.), aby doprowadzić do ujednolicenia preparatów w skali międzynarodowej.

Na zakończenie Zjazdu odbyło się zebranie przedstawicieli producentów, kontrolerów i technologów, na którym w toku dyskusji stwierdzono konieczność zrzeszenia się. W konsekwencji postanowiono utworzyć, w ramach Międzynarodowego Towarzystwa Mikrobiologów, sekcję immunomikrobiologiczną. Przewodniczącym sekcji został wybrany dr J. Ørskov (Kopenhaga), sekretarzem prof. G. Penso (Rzym), członkami dr A. Meisalova (Moskwa), dr D. Ikić (Zagrzeb), dr J. Desbordes (Paryż) i dr Ch. Mérieux (Lyon).

W czasie Zjazdu odbyło się zebranie delegatów czeskich, jugosłowiańskich i polskich, na którym zastanawiano się nad współpracą odpowiednich zakładów tych krajów.

Jerzy Dubowy (Instytut Przemysłu Fermentacyjnego, Kraków): „Sposoby oznaczania żywotności drobnoustrojów".

Po omówieniu istoty żywotności i dotychczas stosowanych metod jej mierzenia, przedstawiono opis elektroforetycznej mikroskopowej metody, zaproponowanej przez prof. Ludwikę Lepszową.

12 listopada 1957 r.:

Izabela Zgórniak-Nowosielska, Juliusz Reiss i Wiesław Chaja (Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i I Klinika Chirurgiczna Akademii Medycznej w Krakowie): „Oporność na antybiotyki szczepów bakteryjnych wyosobnionych od chirurgicznie leczonych chorych oraz od nosicieli".

Na 130 zbadanych materiałów ropnych pochodzących od chorych wyhodowano 100 szczepów gronkowca złocistego, 5 szczepów gronkowca białego i 23 innych szczepów bakteryjnych. Spośród 100 wyosobnionych szczepów gronkowca złocistego 65 było opornych na penicylinę, 8 na streptomycynę, 1 na chloramfenikol, 3 na aureomycynę i 3 na terramycynę. Wszystkie szczepy oporne na aureomycynę, terramycynę i streptomycynę były równocześnie oporne na penicylinę. Nie spostrzeżono uderzających różnic między ilością szczepów opornych wyhodowanych od chorych ambulatoryjnych i hospitalizowanych. Stwierdzono większy odsetek gronkowców złocistych opornych u osób leczonych danym antybiotykiem niż u chorych nie leczonych (dla penicyliny u leczonych 72,06%, u nie leczonych 50,0%; dla streptomycyny u leczonych 13,33%, u nie leczonych 7,06%).

Od 30 osób personelu lekarsko-pielęgniarskiego wyhodowano z nosa i ze skóry 53 szczepy gronkowca, z tego 35 złocistego i 18 białego.

Spośród 35 szczepów gronkowca złocistego od nosicieli 26 (74,29%) było opornych na penicylinę, 15 (42,86%) na streptomycynę, nie było szczepów opornych

na chloramfenikol, 2 szczepy były oporne na aureomycynę i terramycynę. Wśród 18 szczepów gronkowca białego nie było szczepów opornych na penicylinę, a 1 szczep był oporny na pozostałe 4 antybiotyki.

U personelu szpitalnego stwierdzono wyższy odsetek szczepów opornych niż u chorych.

Tadeusz Lachowicz (senior) i Tadeusz Romanowski (Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Krakowie): „Ocena różnych kryteriów chorobotwórczości gronkowców, wyosobnionych z przypadków nosicielstwa w badaniach *in vitro*".

Przebadano 738 szczepów gronkowcowych, wyosobnionych z przypadków nosicielstwa, w kierunku ich właściwości chorobotwórczych, uwzględniając szereg prób *in vitro*. Jako próby na chorobotwórczość wzięto pod uwagę zdolność wytwarzania barwnika na pożywkach z dodatkiem soli litu, wytwarzania koagulazy na plazmie ludzkiej: reakcję skłaczania się gronkowców na szkiełku podstawowym (clumping-test), wytwarzania hemolizyny alfa na krwinkach króliczych i odwłóknionej krwi baraniej, tworzenie fosfatazy, żelatynazy i fermentację mannitolu.

Przyjmując jako podstawowe kryterium oceny chorobotwórczości wytwarzanie koagulazy na plazmie króliczej, porównano zgodność poszczególnych odczynów dla 682 szczepów koagulazododatnich, 41 ujemnych i 15 wątpliwych.

Zgodność własności barwnikotwórczych z produkcją koagulazy wynosiła 91,05%, z wytwarzaniem hemolizyny alfa na krwinkach króliczych 93,22%, na odwłóknionej krwi baraniej 79,67%, z reakcją skłaczania (clumping-test) 90,92%, z wytwarzaniem koagulazy na plazmie ludzkiej 75,6%, fosfatazy 97,69%, żelatyny 90,51% i z fermentacją mannitolu 88,88%.

Podsumowując wyniki 7 prób na chorobotwórczość gronkowców, z pominięciem wytwarzania koagulazy na plazmie ludzkiej i hemolizyny alfa na odwłóknionej krwi baraniej, można stwierdzić, że większość ich daje wyniki zgodne z reakcją koagulazy w ponad 90% przypadków i że w zasadzie do oceny chorobotwórczości wystarczy uwzględnić 3 próby, w tym: próbę skłaczania w plazmie ludzkiej (clumping-test), a w wypadku wyniku ujemnego i wątpliwego — odczyn probówkowy na koagulazę w plazmie króliczej, próbę na fosfatazę i zdolności barwikotwórcze.

Dwa czynniki powinny być każdorazowo brane pod uwagę, trzeci natomiast może być dowolnie dobrany i dopiero przy rozbieżności wyników należy uwzględnić dalsze cechy, jak wytwarzanie hemolizyn, żelatynazy i fermentację mannitolu.

11 grudnia 1957 r.

Feliks Przesmycki (Państwowy Zakład Higieny w Warszawie): „Wyniki szczepień przeciwko poliomyelitis w skali ogólnoświatowej".

Próby przygotowania szczepionki przeciwko *poliomyelitis* datują się od r. 1941 Początkowo brak było jasnej koncepcji patogenezy *polio*. Wysuwano hipotezę odporności tkankowej. W oparciu o doświadczenia Bodiana i innych powstała nowa koncepcja patogenezy. Wyróżniono 3 fazy w rozwoju zakażenia: 1) faza jelitowa, 2) faza humoralna, 3) faza przenikania wirusa do centralnego systemu nerwowego.

Wirus może przenikać inną drogą — na przykład przy postaci opuszkowej wirus przenika drogą nerwów wprost do centralnego systemu nerwowego. Liczne prace wykazały, że wirus *poliomyelitis* może namnażać się w różnych tkankach i obecnie uważany jest za wirus pantropowy.

U 70-75% dorosłych występują przeciwciała. Początkowo tłumaczono to zjawisko działaniem bodźców nieswoistych. W ostatnich czasach w USA wykazano, że

powstanie odporności związane jest z rozsianiem wirusa. W gorszych warunkach sanitarnych istnieje większa możliwość zetknięcia się z wirusem, a co za tym idzie — uodpornienie i zachorowanie. U osobników, którzy przed szczepieniem nie mieli w surowicy przeciwciał, zaobserwowano po szczepieniu narastanie ilości przeciwciał. W USA przeprowadzono szczepienie dzieci w dużych grupach. Ogółem zaszczepiono 2 334 000 dzieci. Grupa kontrolna obejmowała 2 362 000 dzieci. U dzieci szczepionych stwierdzono 3-4 razy niższą zapadalność niż u nie szczepionych. W Danii przeszczepiono prawie 4 000 000 ludności, w Czechosłowacji 2 500 000 dzieci. Stwierdzono przy tym obniżenie zapadalności. W Polsce zapadalność wyrażała się cyfrą: w r. 1956 — 8/100 000, zaś w r. 1957 — 3,7/100 000.

Feliks Przesmycki i Helena Dobrowolska (Państwowy Zakład Higieny w Warszawie): „Prace nad szczepionką przeciwpoliomyelityczną w Polsce".

W Polsce w 1955 r. wykonano pierwsze prace organizacyjne, zaś w r. 1956 pierwsze prace eksperymentalne nad przygotowaniem szczepionki poliomyelitis.

Na terenie Warszawy dotychczas przeszczepiono około 30 000 dzieci szczepionką sporządzoną w PZH w Warszawie.

Oddział w Łodzi

20 lutego 1957 r.:

A. Nowakowska (Zakład Mikrobiologii Technicznej Politechniki Łódzkiej): „Laboratoryjne metody otrzymywania autolizatów drożdżowych".

Patrz: *Acta Microbiologica Polonica*, 1957, 6.

K. Kotełko (Zakład Mikrobiologii Szczegółowej Uniwersytetu Łódzkiego): „Podstawy chorobotwórczości *Bacillus anthracis*" (referat przeglądowy).

Irena Januszewicz (Instytut Przemysłu Fermentacyjnego w Warszawie): „Biosynteza dekstranu".

Przedstawiono bogaty materiał doświadczalny, dotyczący biosyntezy dekstranu przez *Leuconostoc mesenteroides*. Autorka omówiła wpływ warunków hodowli, jakości wody produkcyjnej oraz liofilizacji kultur na ich własności biochemiczne i wydajność dekstranu.

K. Zakrzewski (Instytut Hematologii w Warszawie): „Struktura i własności lecznicze dekstranu".

Na podstawie prac własnych i najnowszego piśmiennictwa zostało omówione zagadnienie leków krwiozastępczych. Podano metody badań fizykochemicznych nad strukturą cząsteczki dekstranu, z uwzględnieniem stosunku liczby wiązań 1,4 : 1,6. Referent przedstawił charakterystykę destranu różnego pochodzenia oraz własności terapeutyczne.

10 kwietnia 1957 r.:

A. Horoszewicz, J., Horoszewicz i S. Kałużewski (Zakład Bakteriologii Akademii Medycznej w Łodzi): „Badania nad zmiennością typu *L* rodzaju *Klebsiella*".

Autorzy przedstawili wyniki badań własnych nad tym zagadnieniem, podkreślając szczególnie wpływ pewnych składników pożywki i warunków hodowli

na powstawanie i przesiewanie form *L*. Dalsze obserwacje dotyczyły badań ciągłych w mikroskopie fazo-kontrastowym, procesów powstawania i rozwoju form *L*. Stosując odczyny precypitacji i wiązania dopełniacza autorzy porównywali własności antygenowe szczepów wyjściowych oraz drobnoustrojów w formie zmienionej. W doświadczeniach na myszach przeprowadzono próby określenia chorobotwórczości form *L*. Wyniki ilustrowano 80 zdjęciami przeźroczowymi oraz około 150 mikrofotografiami.

A. Ber, L. Dryżek-Mikołajczykowa i H. Mikołajczyk (Zakład Endokrynologii Akademii Medycznej w Łodzi): „Badania własne nad układem hialuronidaza — kwas hialuronowy u bakterii.

Autorzy zaobserwowali, iż szereg gatunków drobnoustrojów w pożywce płynnej z dodatkiem kwasu hialuronowego rośnie w postaci zlepianej i wytwarza pewne substancje zbliżone do mukopolisacharydów, rozkładane często przez hialuronidazę. Stwierdzono następnie, że niektóre szczepy tworzą hialuronidazę w zwykłej hodowli bulionowej lub w obecności kwasu hialuronowego.

Opierając się na tych obserwacjach autorzy sądzą, że znalezienie szczepu nie wytwarzającego ani hialuronidazy ani substancji mukopolisacharydowych mogłoby służyć do opracowania metody biologicznego miareczkowania hialuronidazy.

Dnia 16 maja 1957 r.:

G. Bagdasarian (Instytut Matki i Dziecka w Warszawie): „Zastosowanie metody oksytropii do zagadnień biologicznych").

Autor omówił część teoretyczną i zastosowanie praktyczne metody oksytropii oraz własne wyniki badań. Oznaczanie tzw. liczby tlenowej pozwala w sposób ścisły oznaczyć w pracach mikrobiologicznych: własności podłóż, ilość biomasy komórkowej, zużycie substratów organicznych podłoża, inhibicyjne działanie antybiotyków na drobnoustroje, wpływ czystych związków organicznych lub mieszanin o dowolnym składzie.

G. Kerszman (Zakład Mikrobiologii Szczegółowej Uniwersytetu w Łodzi): „Wirusy bakteryjne" (referat przeglądowy).

12 czerwca 1957 r.:

Bernard Zabłocki (Zakład Mikrobiologii Szczegółowej Uniwersytetu Łódzkiego): „Systematyka rodziny *Enterobacteriaceae*" (referat przeglądowy).

A. Jerzmanowski i K. Ubysz-Jerzmanowska (Zakład Bakteriologii Akademii Medycznej w Łodzi): „Zmienność maczugowców błonicy pod wpływem antybiotyków. Doniesienie I. Zmiany zachodzące pod wpływem działania penicyliny i aureomycyny".

Autorzy badali wpływ dużych stężeń penicyliny i aureomycyny na maczugowce błonicy. Do doświadczeń użyto 15 szczepów *C. diphteriae*. Po zadziałaniu na szczepy penicyliną uzyskiwano kolonie zmienione, które swym wyglądem przypominały odmiany szorstkie spotykane u innych gatunków bakteryjnych.

Poza tym w jednym przypadku wyizolowano odmianę nietoksynotwórczą, wytwarzającą stale w przesiewach bardzo małe kolonie. Wariant ten pozbawiony był własności hemolitycznych, rozkładał z dużym opóźnieniem typowe węglowodany

i dodatkowo zakwaszał sacharozę. W doświadczeniach z aureomycyną uzyskano 3 szczepy zachowujące się podobnie do opisanej powyżej odmiany.

23 października 1957 r. (wspólnie z Łódzkim Oddziałem Polskiego Towarzystwa Lekarskiego):

K. Alkiewicz (Zakład Mikrobiologii Akademii Medycznej w Poznaniu): „Mikrobiologia i klinika drożdżyc" (referat przeglądowy).

R. Stempień, H. Niedzielska, I. Kularska, Z. Kacprzak, J. Lewicka i A. Luft (Miejska Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Łodzi): „Flora bakteryjna jelitowa u chorych leczonych chloromycetyną".

Autorzy opisują zaburzenia obserwowane u 100 osób chorych na różne choroby zakaźne, leczonych chloromycetyną. Normalna flora jelitowa zanikała zwykle w pierwszych dniach leczenia, z równoczesnym pojawieniem się szczepów chorobotwórczych, jak koagulazododatnie gronkowce złociste, otoczkowce, pałeczki odmieńca, drożdżowce. Od strony klinicznej pojawiały się nieżyty żołądkowo-jelitowe mniej lub bardziej liczne. Zaprzestanie podawania chloromycetyny w przeciągu paru dni prowadziło do poprawy stanu chorego, jednocześnie flora jelitowa wracała do normy.

Przy braku poprawy, zwłaszcza w razie stwierdzenia gronkowców złocistych w kale, podawano erytromycynę.

Wyhodowane drobnoustroje wykazały oporność na penicylinę, aureomycynę i terramycynę oraz słabą wrażliwość na streptomycynę i chloromycetynę. Przy zaburzeniach ze strony przewodu pokarmowego przerywano podawanie chloromycetyny, co prowadziło do poprawy stanu ogólnego. W przypadkach cięższych podawano z dobrym skutkiem erytromycynę.

18 grudnia 1957 r.:

J. Grunwald (Pracownia Biochemii i Biofizyki PAN): „O mechanizmie powstawania uszkodzenia biologicznego skutkiem działania promieni jonizujących" (referat przeglądowy).

J. Chomiczewski (Zakład Bakteriologii Akademii Medycznej w Łodzi): „Wspomnienie o Odonie Bujwidzie".

Oddział w Gdańsku

25 czerwca 1957 r.:

Z. Kryński, K. Zawrocka i E. Beda: „Oporne gronkowce w domach małego dziecka w województwie gdańskim".

W trzech domach małego dziecka stwierdzono wśród dzieci duży odsetek nosicielstwa gronkowców opornych na antybiotyki, zwłaszcza na penicylinę. Znaleziono pod tym względem duże różnice między poszczególnymi domami.

J. Borowski i R. Tybusz: „Inhibitory w normalnych surowicach ludzkich".

W surowicach ludzkich stwierdzono obecność jakichś ciał hamujących wzrost bakterii.

W. Chwistecka: „Zarys prac prowadzonych w Pracowni Poliomyelitis w Instytucie Medycyny Morskiej".

10 grudnia 1957 r.:

S. Kryński: Wspomnienie pośmiertne o prof. R. Weiglu.

K. Ulewicz (Laboratorium Sanitarno-Higieniczne Marynarki Wojennej): „Badania nad zachowaniem się zlepników w surowicach nurków".

Przebadano odczyny zlepne u 30 nurków, odbywających zajęcia szkoleniowe w komorze ciśnieniowej, nurkujących pod wodą lub wykonujących prace podwodne, oraz u 68 marynarzy nie nurkujących. Stwierdzono w większości przypadków spadek mian zlepników dla antygów *Salmonella typhi* i *Salmonella typhimurium*, natomiast miana przeciwciał dla antygenu *Shigella shigae* pozostawały w większości przypadków bez zmian. Zwiększanie głębokości nurkowania powodowało wybitniejszy spadek mian przeciwciał. Podobnie wpływało przedłużanie czasu nurkowania. Praca podwodna nie wpływa natomiast w wybitniejszy sposób na zachowanie się odczynów zlepnych.

Z. Kawecki i H. Wysoczyńska (Instytut Medycyny Morskiej: „Izolacja szczepów kleszczowego zapalenia mózgu z polników zwyczajnych (*Microtus arvalis*) złowionych na terenie województwa szczecińskiego".

Z polników zwyczajnych izolowano 5 szczepów wirusów. Szczepy te przy pomocy próby neutralizacji i próby wiązania dopełniacza porównano ze szczepami kleszczowego zapalenia mózgu Moskwa 256 i Hanzalova, ze szczepem Louping ill i ze szczepem Theilera. Stwierdzono, że szczepy izolowane są bardzo podobne serologicznie do szczepów Moskwa 256, Hanzalova i Louping ill, a zupełnie odmienne od szczepu Theilera.

Z. Buczowski (Instytut Medycyny Morskiej): Sprawozdanie z III Kollokwium lizotypii.

Oddział w Lublinie

27 marca 1957 r.:

C. Marderowicz (Zakład Mikrobiologii Akademii Medycznej w Lublinie): „Charakterystyka gronkowców wyosobnionych od dzieci i dorosłych".

Przedstawiono charakterystykę 200 szczepów gronkowców złocistych wyosobnionych z materiału chorobowego.

Najwięcej szczepów opornych na penicylinę znaleziono w grupie gronkowców o ustalonych cechach biochemicznych, uważanych za cechy związane z patogennością tych zarazków. W grupie tej znajduje się 18% wrażliwych na penicylinę zarazków, 62% wrażliwych na streptomycynę, 76% wrażliwych na chloromycetynę, 80% wrażliwych na aureomycynę i terramycynę; wszystkie natomiast były wrażliwe na erytromycynę.

Z. Hencner (Zakład Mikrobiologii Akademii Medycznej w Lublinie): „Badania nad odczynem wiązania dopełniacza i odczynem hemaglutynacji Middlebroocka-Dubosa w gruźlicy".

10 maja 1957 r.:

Z. Opara (Zakład Mikrobiologii Akademii Medycznej w Warszawie): „Wybrane zagadnienia z genetyki bakterii" (referat przeglądowy).

Z. Lorkiewicz (Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie): „Badania nad budową antygenową *L* postaci".

Autor, używając metod aglutynacji i precypitacji, wykazał istnienie różnic antygenowych między typem *3A* i *3B*. Wyniki aglutynacji i wysycania surowic pozwalają sądzić, że pokrewieństwo między antygenem bakteryjnym *H* a antygenem *3B* jest większe niż między antygenem *H* a formą *3A*. W odczynie precypitacji zwykłej reakcje krzyżowe między antygenami form *3A* i *3B* oraz odpowiednimi surowicami wykazują mniejsze miano aniżeli reakcje homologiczne.

24 października 1957 r.:

Demonstracje przypadków klinicznych: *Adenocarcinoma* płuc — imitując rozsiew gruźlicy (Klinika Ftyzjatryczna).

J. Parnas (Zakład Mikrobiologii Akademii Medycznej w Lublinie): „O współczesnym stanie badań nad fazą przesączalną bakterii" (referat przeglądowy ilustrowany filmem).

C. Marderowicz (Zakład Mikrobiologii Akademii Medycznej w Lublinie): „Zakażenie wewnątrzszpitalne zarazkiem *Salmonella typhi*".

Opisano przypadek kliniczny zachorowania na dur brzuszny lekarza chirurga i dwu sanitariuszek, które brały udział w operacji chorego operowanego z powodu perforacji jelit, spowodowanej owrzodzeniami durowymi. Z krwi chorego wyhodowano zarazki *Salmonella typhi*. Po odpowiednim okresie inkubacji zachorowały dwie sanitariuszki, które myły narzędzia po operacji i lekarz chirurg wykonujący zabieg. U wszystkich chorych udało się wyizolować z krwi lub kału zarazek *Salmonella typhi*.

28 listopada 1957 r.:

T. Jastrzębski (Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej WSR w Lublinie): „W stulecie urodzin Odo Bujwida".

K. Dygdała (Zakład Mikrobiologii Ogólnej UMCS w Lublinie): „Rozwój lekooporności u bakterii' (referat przeglądowy).

K. Wawrzkiewicz (Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej WSR w Lublinie): „Nowa postać włoskowca różycy".

Na pożywce agarowej z dodatkiem 10% normalnej surowicy końskiej stwierdzono u szczepu różycowego Nr *126* oprócz kolonii w postaci *S* i *R* trzeci typ kolonii oznaczonej przez autorkę jako *B*. Typ *B* różni się od typu *S* i *R* barwą kolonii, ich wielkością, kształtem i budową, wyglądem zarazka w preparatach metodą Grama i zredukowanym znacznie systemem enzymatycznym. Inne właściwości, jak aglutynacja, precypitacja, zjadliwość dla myszek białych — nie odbiegają od typów włoskowca.

Postać *B* powstaje z postaci *S*. Wielokrotnie obserwowano również przechodzenie postaci *B* w postać *S*.

Ani razu nie zauważono rozbicia formy *R* na *R* i *B*, ani też zjawiska odwrotnego.

5 grudnia 1957 r.:

B. Babudieri (Instituto Superiore di Sanita, Rzym): „Badania nad gorączką *Q* we Włoszech", „Badania nad leptospirozą we Włoszech".

12 grudnia 1957 r.:

E. Strzelczyk (Zakład Mikrobiologii Rolniczej WSR w Lublinie): „Wpływ różnych roślin uprawnych na rozwój *Azotobacter* i *Clostridium*".

W latach 1956-1957 badano wpływ 14 różnych roślin uprawnych (zbożowe, motylkowe, przemysłowe) na rozwój azotobaktera i *Clostridium* w glebie. Badania przeprowadzano w ciągu obu lat w następujących okresach rozwojowych roślin: wczesny okres wegetacyjny, przed kwitnieniem, w czasie kwitnienia i w czasie owocowania. Kilka roślin badano jeszcze po zbiorach plonów.

W wyniku badań stwierdzono niewątpliwy wpływ zbadanych roślin na rozwój azotobaktera i *Clostridium*. Rozwój ten zależał od gatunku rośliny, jak i od stadium rozwojowego roślin. Wśród zbadanych roślin szczególnie silnie stymulowały rozwój azotobaktera: rzodkiewka, mak, groch, łubin i jęczmień. Żadnego działania nie wykazywał owies. Nie znaleziono azotobaktera jedynie na korzeniach cebuli. Na ogół wszystkie spośród zbadanych roślin stymulowały też rozwój *Clostridium*. Najsilniej stymulowały rozwój *Clostridium* te rośliny, które pobudzały też silnie rozwój azotobaktera.

B. Strzelczykowa (Zakład Mikrobiologii Rolniczej WSR w Lublinie): „Wpływ promieniowców antagonistycznych na bakterie glebowe".

Przeprowadzono dwuletnie badania nad ilościowym występowaniem promieniowców antagonistycznych w rizosferze różnych roślin uprawnych w różnych okresach ich rozwoju oraz w glebie oddalonej od korzeni. W toku tych badań wyizolowano około 170 szczepów promieniowców antagonistycznych i zbadano ich właściwości antagonistyczne i hodowlane. Spośród wyizolowanych szczepów promieniowców wybrano najbardziej antagonistyczne i zbadano ich wpływ na następujące bakterie glebowe: *Azotobacter*, *Clostridium*, *Rhizobium*, bakterie nitryfikacyjne i błonnikowe.

K. Bereśniewicz (Zakład Mikrobiologii Rolniczej WSR w Lublinie): „Zastosowanie metody głębinowej w hodowli powoli rosnących bakterii brodawkowych".

Praca ta ma na celu poszukiwanie metod hodowli głębinowej przyspieszającej wzrost wolno rosnących *Rhizobium*. Poza określeniem wpływu nawietrzania podłoża na wzrost tych bakterii bada się wpływ składu pożywki. Dotychczas stosowano dodatek hydrolizatu kazeiny i syropu ziemniaczanego, jako źródła węgla. Badania prowadzono metodą hodowli głębinowej typu trzęsawkowego. Obserwacje wykazały, że nie wszystkie szczepy *Rhizobium* reagowały w ten sam sposób na dodatek wspomnianych składników. Na ogół hydrolizat kazeiny wzmagał wzrost *Rh. lupini* i *Rh. meliloti*. Jednak *Rh. meliloti* wykazywał obniżenie zdolności namnażania się pod wpływem dodatku syropu ziemniaczanego.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 83-92

RECENZJE

CIBA Foundation symposium on drug resistance in micro-organisms-mechanisms of development

(pod redakcją G. E. W. Wolstenholme i Cecili M. O'Connor), London — J. & A .Churchill Ltd., 1957. Cena 54 s., str. 352, ilustr. 62.

W marcu 1957 r. w Londynie, z inicjatywy Fundacji CIBA, odbyło się sympozjum poświęcone mechanizmowi rozwoju lekooporności u mikroorganizmów. Cel Z'jazdu określił w przemówieniu wstępnym przewodniczący — Charles Harington, zwracając uwagę na dysproporcję między rozwojem chemii farmaceutycznej i praktycznej chemoterapii, a stanem wiedzy o biologicznym działaniu leków. Lekooporność drobnoustrojów ze względu na ogromne znaczenie dla terapii wysuwa się na pierwsze miejsce wśród niewyjaśnionych zagadnień biologicznego działania leków. Sympozjum miało przyczynić się do poznania biologicznego i chemicznego aspektu tego zjawiska i dostarczyć informacji dla praktyki klinicznej.

W 18 referatach i w dyskusji zarysowały się główne kierunki zainteresowań nauki o lekooporności. Najwięcej czasu poświęcono mechanizmom odpowiedzialnym za powstawanie form opornych, indukowanej syntezie enzymów oraz metodom badania mechanizmów oporności. Dyskusja nad mechanizmem lekooporności dotyczyła kwestii, czy główną przyczyną pojawiania się w populacji wrażliwej form opornych są niezależne od obecności leku zmiany genowe — mutacje, czy też lek działa swoiście na komórkę, indukując powstanie oporności. W szeregu referatów przedstawiono przeciwstawne często poglądy dotyczące tego zagadnienia.

M. Demerec (Genetic Aspects of Drug Resistance) w obszernym referacie przeglądowym przeprowadza tezę o genowej naturze zmian oporności na leki, opierając się w dużej mierze na obszernych badaniach własnych i swego laboratorium. Spontaniczny charakter tych zmian potwierdzają testy: fluktuacyjny, płytek odciskowych, pośredniej selekcji oraz test Newcombe'a.

Za mutacyjnym charakterem zmian przemawia też ich niska częstość. Analiza rekombinacji, transformacji i transdukcji wskazuje, że cechy lekooporności są kontrolowane przez geny. Badania nad opornością na penicylinę i streptomycynę wykazały, że nabywanie lekooporności może odbywać się jednostopniowo, jak to się dzieje w wypadku streptomycyny, lub w kilku odgraniczonych stadiach, o coraz to wyższej oporności. Ten drugi rodzaj przemian charakterystyczny jest dla penicylino-oporności.

Demerec zwrócił uwagę na fakt, że nabywanie oporności przez bakterie dotyczy zwykle jednego tylko leku. Z genetycznego punktu widzenia wskazuje to, że za

oporność na różne leki odpowiedzialne są mutacje różnych genów. Mała częstość mutacji sprawia, że praktycznie możliwość zmiany polegającej na oporności do kilku leków łącznie jest znikoma. Stąd wniosek dla terapii, że równoczesne stosowanie wielu chemoterapeutyków daje pewniejsze rezultaty.

Według autora głównym mechanizmem nabywania lekooporności są mutacyjne, niezależne od obecności leku, zmiany genowe. Bezpośredni wpływ leku na metabolizm rzadko kiedy jest przyczyną oporności.

Zupełnie przeciwstawne poglądy reprezentuje Hinshelwood i jego szkoła. Przedstawili je A. C. R. Dean i C. Hinshelwood (Aspects of the Problem of Drug Resistance in Bacteria). Nie negując dziedzicznego charakteru podstawowych właściwości komórki i roli kwasów nukleinowych w dziedziczności, nie zgadzają się oni z poglądem, jakoby jedynym, lub nawet głównym mechanizmem powstawania form opornych były niezależne od środowiska zmiany mutacyjne.

Autorzy proponują prosty model zmienności oparty na teorii adaptacji automatycznej. W myśl tej teorii o przebiegu metabolizmu decyduje stan równowagi między środowiskiem a komórką i zakłócenia tej równowagi odbijają się w składzie ilościowym cytoplazmy i substancji jądrowej, co powoduje ilościowe zmiany metaboliczne.

Według autorów dziedziczność u organizmów rozmnażających się przez prosty podział jest tylko pewną formą stałości fizjologicznej, gdyż komórki potomne są połówkami komórki macierzystej. Autorzy przedstawiają wyniki szeregu starannie zaplanowanych eksperymentów przeprowadzonych w ostatnich latach w pracowni Hinshelwooda. Badania te dotyczą tak lekooporności, jak i zdolności do rozkładania cukrów — zwłaszcza laktozy przez *E. Coli mutabile* i arabinozy przez *B. lactis aerogenes*. Możliwość uzyskania względnie stałych zmian metabolicznych, dotyczących większości populacji, na drodze trenowania oraz szczegółowe badania ilościowe nad warunkami i przebiegiem powstawania tych zmian prowadzą autorów do wniosku, że głównym ich źródłem jest adaptacja fizjologiczna.

Fizjologiczny mechanizm nabywania nowych cech metabolicznych przez drobnoustroje przedstawił K. W. Kossikow (Directed Hereditary Changes of Fermentative Properties of Yest by a Specific Substrate). Badano nabywanie nowych własności fermentacyjnych przez drożdże. Stosując długotrwałe hodowle wielkich ilości komórek na podłożach z cukrami, autor uzyskiwał adaptację do wykorzystywania tych cukrów. Zmiana pojawiała się bardzo późno, po długiej hodowli, i była dziedziczna tak przy rozmnażaniu wegetatywnym, jak i płciowym. Nowa cecha ulegała segregacji i zachowywała dużą stałość mimo licznych pasaży przez podłoża nie zawierające cukru, do którego nastąpiła adaptacja. Aby zbadać czy zmiana jest indukowana przez cukier obecny w podłożu, czy też jest spontaniczna, przeprowadzono dodatkowe doświadczenia. Ustalono, hodując populacje mieszane, że rozwój osobników fermentujących jest hamowany przez formy niefermentujące, tak że dla ujawnienia przy pomocy stosowanej metody (pomiar ilości gazu wydzielanego podczas fermentacji) jednej komórki fermentującej na 300 milionów niefermentujących potrzeba 24 dni wspólnej inkubacji na podłożu z cukrem. Dlatego okres 24 dni ustalono jako graniczny dla ujawnienia się zmian mutacyjnych, a pojawienie się oznak fermentacji po czasie dłuższym niż 24 dni traktowano jako dowód zmiany indukowanej przez obecność cukru. Ponieważ różnice między gatunkami drożdży polegają często na odmiennych własnościach fermentacyjnych, autor zwrócił uwagę na gatunkotwórcze, ewolucyjne znaczenie tego typu zmian, które powstając na drodze fizjologicznej są równoważne zmianom polegającym na mutacji genowej.

Wydaje się, że stosowanie czasu jako kryterium charakteru zmiany może budzić szereg zastrzeżeń. Wysiew wielkich ilości komórek nie pozwala na dokładne uchwycenie zmian zachodzących w hodowli i czas pojawiania się odmian fermentujących nie jest najlepszym sprawdzianem ich pochodzenia. Zarówno zanieczyszczenia podłoża, jak i produkty autolizy ginących komórek, których w dużych populacjach gromadzi się sporo, mogą w różny sposób wpływać na tempo wzrostu komórek przeżywających, opóźniając rozwój jednych, stymulując inne. W podłożu z nieprzyswajalnym źródłem węgla, do którego ma zajść adaptacja, możliwe są resztkowe podziały komórek i pewien ograniczony wzrost. Może więc operować tu zarówno fizjologiczny mechanizm zmienności, jak i genowy. Czas, w którym zmiana się ujawnia, może być różny i zależeć nie tyle od jej mechanizmu, ile od szeregu innych czynników.

W dyskusji nad tą pracą N. D. Jerusalimski przedstawił własne wyniki badań nad trenowaniem zarodnikujących laseczek *Cl. acetobutylicum* do wzrostu na zwiększonych stężeniach butanolu. W wyniku trenowania udawało się z czasem uzyskać zmianę dziedziczną, przekazywaną tak podczas podziału, jak i przez zarodniki. Według autora przetrwanie nowonabytej cechy przez stadium zarodnika świadczy o jej silniejszym utrwaleniu dziedzicznym i jest zasadniczym momentem w dalszym jej utrwalaniu.

Obie prace badaczy radzieckich, jak to stwierdził w dyskusji Jerusalimski, miały zwrócić uwagę na podzielany przez wielu ich rodaków pogląd o możliwości przekształcania zmian nabytych adaptacyjnie w zmiany dziedziczne. Stwierdził on też, że nie ma żadnych naukowych podstaw do twierdzenia, że mutacja jest jedyną formą zmian dziedzicznych.

Yudkin przedstawił wyniki pracy (M. Thornley, J. Sinai, J. Yudkin: Multiple mechanisms of Acquired Drug Resistance), w której badano możliwość występowania różnych mechanizmów nabywania lekooporności w tym samym układzie: drobnoustrój — lek.

Wykazano, że oporność na proflawinę w populacjach *E. coli* może powstawać na różnych drogach. Jak wykazały badania przy pomocy metody płytek odciskowych i testu fluktuacyjnego, oporność pojawia się jako wynik spontanicznej mutacji. Mutanty wykazują duży stopień oporności. Cecha ta jest sprzężona z opornością na chloramfenikol. Mutacja jest kilkustopniowa.

Oporność daje się transformować. Wyciągi z komórek opornych otrzymywane przy pomocy różnych metod transformują komórki wrażliwe. Za transformację odpowiedzialny jest DNA, co wykazały eksperymenty z dezoksyrybonukleazą.

Dodatnie rezultaty dały badania nad trenowaniem komórek do wzrostu w obecności leku. Poszczególne klony wykazywały duże wahania w szybkości adaptowania się. Oporność uzyskiwana tą drogą była względnie stała i trudno było uzyskać całkowitą rewersję. Nawet po jednorazowym pasażu komórek przez lek oporność utrzymywała się długo. Wyniki te są sprzeczne z niektórymi wynikami Hinshelwooda. Oporność jest większa i bardziej stała, brak również korelacji między opornością a stężeniem leku, który ją wywołał.

Stopniowe dodawanie leku w krótkich odstępach czasu do rosnącej kultury pozwoliło uzyskać fenotypową zmianę oporności, dotyczącą większości populacji. Oporność okazała się zależna od stadium wzrostu hodowli.

Badania nad zsynchronizowaną populacją wykazały, że są różnice między częstością podziału a wahaniami oporności. Autorzy doszli do wniosku, że w tym wypadku zmiany oporności polegają na zwiększonej zdolności do adaptacji w pewnych stadiach wzrostu, która to zdolność jest w obecności leku utrzymywana przez

cały cykl podziałowy. Zjawisko to tłumaczy również ciągłe narastanie oporności w niezsynchronizowanej kulturze.

Uzyskano również zmienność określaną przez autorów jako lemarkistowski typ dziedziczności. Badania przeprowadzono na komórkach rosnących i spoczynkowych. Hodując szczepy szorstkie w obecności proflawiny, ekstraktów komórkowych i wody wodociągowej uzyskano duży wzrost oporności u około 10% komórek. Dużą rolę przy tym zjawisku odgrywała obecność ekstraktów komórek (wrażliwych — co wyklucza transformację). Autorzy nie potrafią wykluczyć selekcji, ale są przekonani, że jest to swoista indukcja zmian dziedzicznych przez lek. Narastanie oporności u komórek spoczynkowych badano w buforowej zawiesinie przepłukanych komórek, inkubowanych w 37° w obecności małej ilości leku. Po czternastodniowej inkubacji, przy braku podziałów, zaobserwowano u około 80% populacji wzrost oporności. Indukcja nie zachodziła przy niższych temperaturach i niskich koncentracjach komórek. Zmiana okazała się dziedziczna i formy oporne wykazywały oporność krzyżową z chloramfenikolem i aureomycyną.

Z badań tych wynika, że wiele mechanizmów nabywania lekooporności może zachodzić jednocześnie, a doświadczenia uwidaczniają często jeden z nich.

Jeden z możliwych mechanizmów nabywania lekooporności na drodze adaptacji fizjologicznej przedstawił W. Kunicki-Goldfinger (Adaptation of bacteria to antibiotics).

Akiba i Szybalski wykazali narastanie streptomycynooporności w populacji *E. coli*, inkubowanej przez długi czas w buforze w obecności streptomycyny. Zmiana dotyczyła większości populacji i miała charakter genowy, co wykazały doświadczenia nad rekombinacją. Brak wzrostu miał wykluczać selekcję mutantów. Wynik wskazywał na swoiste, mutagenne działanie streptomycyny. Autor powtórzył to doświadczenie w nieco odmiennych warunkach. Bakterie inkubowano w buforze ze streptomycyną w temperaturze 4°. Zaobserwowano narastanie oporności. Okazało się jednak, że analogiczne wyniki daje ochładzanie zawiesiny w samym buforze bez streptomycyny. Zmiana więc nie polega na działaniu leku. Nie można jednak wykluczyć masowej mutacji do oporności pod wpływem innego czynnika.

Oporność okazała się względnie stała, lecz rewersja zachodziła po pewnym czasie. Podczas inkubacji w buforze w niskiej temperaturze, obok szeregu zmian w morfologii i typie wzrostu komórek, zachodziła wyraźna synchronizacja podziału. Stosunek czasowy między synchronizacją a opornością wskazywał na niezależność tych zjawisk. Jeżeli oporność komórki jest zależna od ilości pewnych określonych struktur cytoplazmatycznych, to przy niezbalansowanym wzroście ilość tych struktur może się znacznie zwiększyć. W ten sposób inkubacja w buforze w niskiej temperaturze może genotypowo wrażliwe komórki przekształcić przejściowo w oporne. Po przesianiu tak zmienionej komórki na podłoże ze streptomycyną jest ona zdolna do wytworzenia klonu, co umożliwia pojawienie się w jego obrębie opornego mutanta.

Autor postuluje więc istnienie, obok mutacji i kierowanej adaptacji, trzeciego mechanizmu, gdy czynnik wewnętrzny wywołuje półstałą zmianę fizjologiczną, nie mającą w danych warunkach wartości adaptacyjnej. Po zmianie warunków właściwość nowonabyta może mieć wartość adaptacyjną i zwiększać znacznie możliwość zajścia odpowiedniej mutacji. W dyskusji nad tym referatem Györffy podał, że podobne zjawisko zaobserwował u *Serratia marcescens* w zbliżonych warunkach doświadczenia, lecz nie badał tego bliżej.

Na zjeździe B. Györffy i J. Kallay przedstawili krótkie doniesienie (Development of Resistance to Streptomicin in *Serratia marcescens*), w którym,

w oparciu o znane testy Lurii i Delbrücka oraz metodę płytek odciskowych, wykazali, że streptomycynooporność *Serratia marcescens* pojawia się jako wynik mutacji, zachodzącej szczególnie w wypadku niższej oporności, wielostopniowo.

Zagadnienie narastania oporności w formie wielu, ściśle odgraniczonych stopni omówił krytycznie R. Hughes (Inheritance in Single Bacterial Cell). Badając dziedziczność pojedynczych komórek bakteryjnych, przy zastosowaniu metody filmowania, wykazał on duże wahania w oporności i różnice w zachowaniu się na podłożach z lekiem wśród potomstwa jednej komórki. Wskazuje to według autora na fakt, że nabywanie oporności może odbywać się bardzo powoli, przez niewielkie, stopniowe zmiany selekcyjne wśród organizmów różniących się od siebie tylko o tyle, o ile mogą różnić się od siebie jednostki każdej populacji. Przy badaniach populacji jako całości można otrzymać obraz wielostopniowej oporności, co jest według Hughesa spowodowane niedoskonałością metodyki.

B. O. Davis w swym referacie [Phisiological (Phenotypic) mechanisms Responsible for Drug Resistance] przedstawił nieco inny aspekt zagadnienia lekooporności. Pomijając mechanizmy, dzięki którym zmiana pojawia się w komórce i jest przenoszona, omówił on fizjologiczne mechanizmy odpowiedzialne za lekooporność. Istnieje dużo teoretycznie możliwych zmian funkcji komórki, prowadzących do lekooporności:

1. Odmienna droga metabolizmu omijająca zablokowaną reakcję.
2. Zwiększenie koncentracji metabolitu, który jest antagonistą inhibitora.
3. Zwiększona produkcja blokowanego enzymu.
4. Obniżenie zapotrzebowania na produkt zablokowanego systemu enzymatycznego.
5. Inaktywacja inhibitora przez enzym komórkowy.
6. Tworzenie odmiennego enzymu o obniżonym powinowactwie do inhibitora lub podwyższonym powinowactwie do substratu.
7. Zmiany w przepuszczalności komórki.

Trzy ostatnie mechanizmy wydają się najważniejsze. Autor bliżej omawia tworzenie enzymów o odmiennym powinowactwie do inhibitora i zmiany przepuszczalności komórki. Tworzenie enzymów o zmienionym powinowactwie do substratu i inhibitora wykryto jako wynik mutacji u licznych drobnoustrojów. Zmiana jest zwykle bardzo niewielka i przypuszcza się, że polega na nieznacznym odkształceniu struktury genowej.

Badania ostatnich lat dostarczyły licznych informacji o przepuszczalności komórek. Wykryto wybiórcze systemy przenoszące substraty do komórki. Okazało się, że właściwości tych systemów są analogiczne z właściwościami enzymów adaptacyjnych. Mutacja lub adaptacja fizjologiczna może zmieniać właściwości systemów transportujących i nie dopuszczać do wniknięcia leku do komórki.

Rolę zmian w powinowactwie enzymu do substratu i inhibitora oraz zmian w przepuszczalności komórki dla leku, jako zasadniczych mechanizmów odpowiedzialnych za oporność, potwierdziły przedstawione na zjeździe wyniki R. D. Hotchkissa i A. H. Evans (Genetic and Metabolic mechanisms underlying Multiple Levels of Sulphonamide Resistance in Pneumococci).

W badaniach nad transformacją sulfonamidooporności u pneumokoków przy użyciu wysokoopornego szczepu jako donatora D. N. A. w wyniku transformacji uzyskano tylko kilka osobników o oporności równej oporności donatora i szereg form o mniejszej oporności, dających się podzielić na kilka odgraniczonych klas, różniących się znacznie między sobą. Takie rozszczepienie powtarzało się przy dalszej transformacji, przy użyciu preparatów DNA z poszczególnych klas.

Krzyżowa transformacja wykazała, że każda z klas przedstawia określony genotyp, przenoszony podczas transformacji niezależnie od pozostałych i decydujący o stopniu oporności. Spotkanie się w obrębie komórki, w wyniku transformacji, dwóch genotypów daje oporność charakterystyczną dla trzeciego, znacznie wyższą od pozostałych, ale należącą do jednej z podanych klas. Wskazuje to, że podczas transformacji przenoszone są pewne fragmenty struktur genowych odpowiedzialnych za oporność. Struktury, określające tą samą cechę fenotypową w różnym stopniu, zdają się być fragmentami tego samego genu.

Zjawisko to łącznie z obserwacją, że do cofnięcia inhibicji wzrostu przez lek potrzebny jest określony stosunek stężenia P. A. B. do ilości dodanego inhibitora, najłatwiej wyjaśnić różnym powinowactwem enzymu do inhibitora, spowodowanym odmiennymi właściwościami tej samej struktury genowej, rządzącej albo syntezą enzymu albo zmianami przepuszczalności błon komórki dla leku.

Autorzy podkreślają też, że przeżywalność w obecności sulfonamidów może być zwiększona przy obecności w podłożu metabolitów biorących udział w blokowanym procesie enzymatycznym. Fakt ten po pierwsze umożliwia podziały komórek, znacznie zwiększając możliwość mutacji, po drugie zaś utrudnia określanie jej częstości.

Mechanizm oporności polegający na wytwarzaniu enzymu rozkładającego inhibitor omówił M. R. Pollock (Penicillin Induced Resistance to Penicillin in Cultures of *Bacillus cereus*).

Penicylinooporność *B. cereus* polega na tworzeniu specyficznego enzymu rozkładającego penicylinę — penicylinazy. W obrębie tej samej populacji enzym może pojawiać się w wyniku mutacji lub swoistej indukcji przez penicylinę obecną w podłożu. W wypadku swoistej indukcji zmiana polega na zwiększeniu pod wpływem leku aktywności systemu tworzącego enzym. Enzym tworzony indukcyjnie jest identyczny z konstytucyjną penicylinazą, powstającą w wyniku mutacji. Różnica polega jedynie na różnej stałości genetycznej systemu tworzącego enzym. Zdaje się, że zmiany penicylinooporności u *B. cereus* polegają na prostych zmianach w ilości tworzonej penicylinazy oraz w szybkości produkcji enzymu. Kompletnie penicylinowrażliwe szczepy tworzą bardzo małe ilości penicylinazy. Penicylinooporność polega tu na zmianie ilościowej w produkcji enzymu, brak więc powstawania nowych jakości.

Zarówno mutacja, jak adaptacja fizjologiczna może tu dotyczyć tylko aktywności systemu tworzącego enzym. Podobnie dzieje się w wypadku wielu innych systemów enzymatycznych. Nie ulega wątpliwości, że zmiany jakościowe enzymów zachodzą, nie wiemy jednak jak często i w jaki sposób. Dotychczasowe wyniki badań nad tym zagadnieniem zawsze zostawiają możliwość zastrzeżeń teoretycznych. Według Pollocka, prosta mutacja w odniesieniu do białek ma charakter czysto ilościowy. Możliwe, że widoczne przy stosowaniu dostępnych technik laboratoryjnych zmiany jakościowe są wynikiem całej serii niedostrzegalnych, drobnych, sukcesywnych zmian. Mutacja może powodować tylko nieznaczne przesunięcia równowagi wewnątrz pozornie homogennej populacji, dotyczące ściśle związanych, lecz odmiennych molekuł o podobnej funkcji.

Potwierdzają to w pewnym stopniu przedstawione na Zjeździe wyniki badań M. Barber (Drug Resistance of Staphylococci with Special Reference to Penicillinase Production). Barber udało się uzyskać, na drodze długiej hodowli wrażliwych penicillinazoujemnych szczepów w obecności niskich stężeń penicyliny, szczepy produkujące bardzo małe ilości penicylinazy. Zmiana była związana z równoczesną utratą zdolności do produkcji koagulazy i α-toksyny. Taka wolna adaptacja do produkcji enzymu może wskazywać na działanie dwu mechanizmów w nabywaniu

oporności przez gronkowce. Zasadniczo adaptacyjny system tworzący enzym może ulegać zmianie mutacyjnej, polegającej na gwałtownym wzroście produkcji enzymu. Selekcja osobników produkujących różne ilości enzymu byłaby odpowiedzialna za pojawianie się szczepów wysokoopornych.

Ciekawy jest również kliniczny aspekt tego zagadnienia. Nabycie zdolności do produkcji enzymów jest związane ze zmniejszeniem patogenności. Infekcje gronkowcowe mogą być często mieszane. Enzym produkowany przez niepatogenny szczep może umożliwiać rozwój osobników wrażliwych i silnie patogennych. Poza tym utrata patogenności związana z produkcją penicylinazy może być zjawiskiem czysto laboratoryjnym, zachodzącym tylko *in vitro*.

Adaptacja do peniciliny *in vitro* jest również możliwa, zwłaszcza w tkankach, gdzie podczas terapii antybiotyk może znajdować się w subbakteriostatycznych stężeniach, a infekcja coraz to nowych osobników może odgrywać rolę kolejnych pasaży. W miarę rozwoju terapii penicylinowej obserwuje się pojawianie coraz większej ilości szczepów opornych należących do grup fagowych, wśród których oporność dotąd nie występowała.

R. Knox (Distribution of Drug Resistant Indywiduals in Cultures of *Mycobacterium tuberculosis*) omówił niektóre problemy lekooporności *Mycobacterium tuberculosis*. Ten ważny problem nastręczał duże trudności metodyczne. Zastosowanie pożywek półpłynnych pozwoliło na liczenie kolonii i określanie ilości opornych. Badając oporność na izoniacyd, Knox, obok kolonii złożonych z osobników wykazujących wysoką i trwałą oporność, znalazł szereg form o niższej i nietrwałej oporności. Pierwsze uważa za mutanty, drugie traktuje jako wynik adaptacji fizjologicznej i zmienności klonalnej, nazywając je pseudomutantami. Oporność pseudomutantów jest często przemijająca. Trzeba je brać pod uwagę jednak przy obliczaniu ilości mutantów w hodowli. Rozważając mechanizm powstawania obu typów form opornych, autor dochodzi do wniosku, że wysoko i trwale oporne osobniki utraciły całkowicie pewne struktury DNA odpowiedzialne za przeprowadzanie reakcji enzymatycznych, blokowanych przez izoniacyd (systemy rozkładające nadtlenki), podczas gdy pseudomutanty pod wpływem niskich stężeń izoniacydu tworzą enzym niewrażliwy na inhibicję, lecz zachowują niezmienione struktury DNA.

Genetyczny aspekt mechanizmów oporności na kolicynę omawiał P. Fredericq (Genetics of Two Diferent Mechanisms of Resistance to Colicins: Resistance by Loss of Specific Receptors and Immunity by Transfer of Colicinogennic Factors). Oporność ta może powstawać na dwóch różnych drogach: przez mutację polegającą na utracie receptorów kolicyny w komórce, lub przez nabycie kolicynogennych właściwości. Wrażliwość na kolicynę jest określana przez ilość wiążących ją receptorów w komórce. Cecha ta jest pod kontrolą genetyczną. Daje się transdukować i rekombinować wykazując sprzężenie z innymi cechami komórki. Istnieje kilka typów kolicyn i oporność na każdą z nich jest związana z osobnym genem. Receptory kolicyny przypominają receptory fagów i często są wspólne dla obu czynników.

Zdolność do produkcji kolicyn również daje się transdukować. Polega to na nabywaniu własności kolicynogennych, bez równoczesnej utraty receptorów. Szczepy, które stały się kolicynogenne na skutek transdukcji, są oporne na działanie kolicyny danego typu. Indukcja syntezy kolicyny powoduje zabicie bakterii. Ten typ oporności przypomina oporność bakterii lizogennych na faga.

W. Hayes (The Phenotypic Expression of Genes Determining Various Types of Drug Resistance Following their Inheritance by Sensitive Bacteria) przedstawił wyniki bardzo ładnie rozwiązanego metodycznie eksperymentu, zmierzającego do

wyjaśnienia przyczyn występującego przy mutacji i rekombinacji opóźnienia fenotypowego ujawniania się cech. Jest kilka możliwych mechanizmów tego zjawiska. Wyjaśnienie jego kinetyki w przypadku mutacji jest trudne, ze względu na działanie wielu czynników ubocznych, mogących zmieniać tempo przejawiania się nowej cechy w fenotypie.

Hayes szuka rozwiązania w badaniach nad rekombinacją. Według autora wniknięcie materiału genowego w postaci chromosomu lub jego fragmentu do komórki podczas koniugacji, transformacji, czy transdukcji, tworzy z niej częściową heterozygotę, wewnątrz której zachodzą procesy reduplikacji i segregacji genów. Przy wniknięciu fragmentu chromosomu komórka może dorobić brakujące części, tak że w wyniku powstaje całkiem nowy chromosom, złożony częściowo z wnikłego fragmentu, a częściowo ze struktur charakterystycznych dla komórki. Jest tu duża analogia do mutacji pewnego fragmentu chromosomu i segregacja oraz reduplikacja przy obu zjawiskach powinna przebiegać podobnie.

Aby zbadać wpływ segregacji na szybkość występowania nabytych przy rekombinacji cech, przeprowadzono krzyżówkę między szczepami *E. coli*, różniącymi się kilkoma cechami. Przenoszony fragment chromosomu zawierał geny określające zdolność do syntezy treoniny i leucyny, oporność na walinę, azydek sodu i fag T_1. Donator był zdolny do syntezy i oporny, akceptor zaś defektywny i wrażliwy. Po wspólnej inkubacji obu szczepów w bulionie w celu uzyskania zygot zawiesinę uwalniano od komórek nie koniugujących, przez dodanie faga T_6, na którego wrażliwy był donator. Zawiesinę zygot wysiewano na stałe podłoże minimalne, na którym możliwy jest tylko wzrost komórek syntetyzujących treoninę i leucynę (T +, L +).

W dwu równoległych seriach płytek zasianych odpowiednio rozcieńczoną zawiesiną zygot badano:

W serii pierwszej kinetykę segregacji, przez określanie przyrostu ilości komórek w czasie (powierzchnię płytek po różnym czasie zalewano ostrym prądem wody destylowanej, aby oddzielić od siebie komórki powstałe podczas ewentualnych podziałów i z ilości kolonii wnioskowano o czasie podziału);

W serii drugiej badano kinetykę fenotypowego ujawniania się cech, przez określanie czasu, po którym pojawi się cecha oporności (powierzchnię płytek spryskiwano odpowiednio roztworem waliny, azydku sodu, lub zawiesiną faga T_1 po różnym czasie inkubacji i liczono ilość pojawiających się kolonii opornych).

Porównanie wyników obu serii wykazało związek fenotypowego przejawiania się cech z segregacją. Cechy kierowane przez geny dominujące ujawniają się w pełni jeszcze przed pierwszym podziałem komórki (oporność na walinę i azydek sodu), podczas gdy dla ujawnienia cech recesywnych (oporność na faga T_4) potrzeba aż trzech podziałów.

L. L. Cavalli-Sforza (Indirect Selection and Origin of Resistance) podał metodę stwierdzania spontaniczności zmian przy użyciu płynnych hodowli, umożliwiającą w odróżnieniu od płytek odciskowych przeprowadzanie analizy ilościowej.

Badając tą metodą pochodzenie oporności na streptomycynę i chloramfenikol *E. coli* K_{12} autor wykazał spontaniczny charakter tej zmiany.

P. Słonimski (P. P. Słonimski i H. de Robichon-Szulmajster: Specific Polyhydroxy Compounds as Cofactors of Enzymic Adaptation and its Inheritance) przedstawił ciekawe wyniki prac nad występowaniem specyficznych kofaktorów działających zarówno podczas zmian mutacyjnych, jak przy indukowanej syntezie enzymów. Wykrycie kofaktorów wynikło z systematycznych badań nad indukowaną syntezą oksydazy cytochromowej u drożdży. Okazało się, że pochodne treozy i erytrozy występujące często jako zanieczyszczenia w handlowych prepa-

ratach cukrów, wpływają tak na częstość indukowanej przez euflawinę mutacji cytoplazmatycznej, powodującej utratę oksydazy cytochromowej, jak i na indukowaną syntezę tego enzymu. Pochodne erytrozy obniżały częstość mutacji i przyspieszały indukowaną syntezę oksydazy, podczas gdy pochodne treozy działały odwrotnie. Również przy indukowanej syntezie maltazy pochodne erytrozy przyspieszają proces, pochodne zaś treozy hamują go.

Kofaktory więc działają nieswoiście i nie są induktorami enzymu, ani nie mogą go zastąpić. Autorzy zwracają uwagę na dwie funkcje materiału genetycznego w komórce. Kieruje on syntezą podobnych do siebie drobin kwasów nukleinowych — autokataliza oraz syntezą określonych enzymów — heterokataliza. Kofaktory to czynniki wpływające na obie te funkcje.

N. Westergaard (On the Identification of Genetic and Non-genetic Variation in Bacteria) rozważył problem zmian genetycznych i niegenetycznych u bakterii. Wiele różnic w poglądach na zmienność może wynikać z różnej nomenklatury tych samych zjawisk. Westergaard, rozpatrując trzystopniowy model przejawiania się cech u organizmów wyższych, próbuje sklasyfikować zjawiska zmienności mikroorganizmów. Według podanego modelu, opierającego się na terminologii cybernetyki, przejawianie się danej cechy zależy od trzech systemów:

1. Informacyjnego — gen,
2. Przenoszącego — enzymatyczne drogi metabolizmu,
3. Receptorowego — swoista reakcja przejawiająca się jako cecha.

Każdy z trzech systemów może ulegać zmianom.

Zgodnie z Westergaardem, zmienność systemu receptorowego to u organizmów wyższych modyfikacje i fenokopie, a u bakterii specyficzna indukcja enzymów, zmienność klonalna i adaptacja fizjologiczna. Zmiany te nie są dziedziczne podczas rekombinacji.

Zmiany systemu przenoszącego to przede wszystkim zmiany cytoplazmatyczne, dotyczące mitochondriów i plastydów. Wykazują one głównie dziedziczność macierzyńską.

Zmiany systemu informacyjnego to dziedziczne mutacje jądrowe. Rodzaj zmiany można określić tylko przez krzyżówki. U bakterii informacji takich może dostarczyć rekombinacja, transformacja i transdukcja, chociaż te dwie ostatnie nie mogą być decydujące, gdyż przenoszeniu ulega tylko część materiału genetycznego. Ciekawych informacji o charakterze zmian może dostarczyć badanie reakcji komórki na środki chemiczne. Każdy z trzech systemów swoiście reaguje na środki chemiczne. Systemy receptorowe są wrażliwe na rozmaite trucizny enzymatyczne, które nie indukując zmian mutacyjnych działają specyficznie przy powstawaniu fenokopii. Systemy przenoszące, obok wrażliwości na szereg zupełnie niespecyficznych środków chemicznych są wrażliwe na działanie substancji niszczących mitochondria i chloroplasty (akryflawiny). Specyficzność odpowiedzi systemów informacyjnych na działanie środków chemicznych jest względna. Jedynie przy mutacji powrotnej występuje duża specyficzność. Ogólnie, bardziej specyficznie działają środki wywołujące mutacje genowe niż substancje rozrywające struktury chromosomowe Tak więc mutagenne działanie środków chemicznych może dostarczyć tylko pewnych informacji o charakterze zmienności, a decydującą rolę muszą odgrywać krzyżówki. Niewyjaśnione jest też zagadnienie mutagennego działania leków.

Westergaard stwierdził, że przytoczony przez niego model wprawdzie nie dotyczy bezpośrednio lekooporności, ale może być pomocny przy rozwiązywaniu tych złożonych problemów.

Alexander (P. Alexander, S. F. Cousens, K. A. Stacey: The Reaction of the Mutagenic Alkylating Agents with Proteins and Nucleic Acids) przedstawił wyniki biochemicznych badań nad reakcjami mutagennych środków alkilujących z białkami i kwasami nukleinowymi. Charakter mutagenny tych substancji jest związany z reaktywnością w stosunku do karboksylowych grup białek i fosforanowych grup D.N.A. i R.N.A. Zdolność do reagowania z innymi grupami czynnymi, jak np. NH_2 i SH nie ma większego znaczenia i jest zupełnie niespecyficzna. Mutagenne środki alkilujące działając na kwasy nukleinowe reagują wyłącznie z grupami fosforanowymi, do których wykazują duże powinowactwo. Szczególnie silny jest efekt mutagenny takich środków alkilujących, które posiadają kilka grup silnie reaktywnych. Tworzą one szereg mostków między grupami fosforanowymi albo wewnątrz tej samej drobiny kwasu nukleinowego, albo między różnymi drobinami. Alkilowanie grup fosforanowych przez mutagen może też być przyczyną rozrywania chromosomów, chociaż w tym wypadku dużą rolę grają inne substancje, obecne równocześnie w podłożu.

Zjazd nie przyniósł ostatecznego rozwiązania problemu lekooporności, co zresztą byłoby celem dziś jeszcze nie osiągalnym. Rzeczowa dyskusja uczonych reprezentujących różne poglądy i badających różne aspekty zagadnienia wytyczyła jednak nowe kierunki badań, niezbędnych dla wyjaśnienia tych problemów.

M. Tabaczyński

(Zakład Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego)

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1958, 7, 93-96

KOMUNIKATY
Nr K. M./95/58 i Nr K. M./97/58

KOMITETU MIKROBIOLOGICZNEGO POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Komitet Mikrobiologiczny przy Wydziale II Polskiej Akademii Nauk ogłasza konkursy na eksperymentalne prace naukowe na tematy:

I. „Zagadnienia z dziedziny metabolizmu drobnoustrojów"
II. „Zagadnienie indukowanej zmienności trwałej u drobnoustrojów"

z terminem nadsyłania prac **do dnia 1 września 1960 r.**

Regulamin konkursów jest następujący:

1. Prawo zgłaszania prac konkursowych mają wszyscy pracownicy naukowi ośrodków krajowych, obywatele polscy.
2. Prace mogą być indywidualne i zespołowe.
3. Do konkursu można zgłaszać prace nie opublikowane lub opublikowane nie wcześniej niż w 1959 r.
4. Autor lub autorzy mogą zgłaszać dowolną ilość prac.
5. Prace powinny być opatrzone imieniem, nazwiskiem i adresem autora (autorów) i nadesłane na adres Komitetu Mikrobiologicznego PAN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki — Wydział II, w nieprzekraczalnym terminie do dnia 1 września 1960 roku (decyduje data stempla pocztowego) w trzech egzemplarzach maszynopisu.
6. W pierwszej połowie września 1960 roku Komitet Mikrobiologiczny PAN ustali skład 3-osobowego Sądu Konkursowego, do którego mogą wejść tylko osoby, które nie nadesłały prac na konkurs.
7. Sąd Konkursowy przedstawia pisemną ocenę prac i umotywowanie decyzji do ostatecznej aprobaty Komitetowi Mikrobiologicznemu PAN. Decyzje Sądu Konkursowego wraz z aprobatą Komitetu Mikrobiologicznego PAN zostaną opublikowane w czasopismach fachowych. Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi w terminie do dnia 1 grudnia 1960 r.
8. Nagrody w konkursach są w zasadzie trójstopniowe, ustala się:

I nagrodę w wysokości zł 7000,—
II „ „ „ zł 5000,—
III „ „ „ zł 3000,—

9. W zależności od wyników oceny prac, nadesłanych na konkurs, Sądowi Konkursowemu i Komitetowi Mikrobiologicznemu PAN przysługuje prawo:
   a) przyznania trzech równorzędnych nagród,
   b) zmniejszenia ilości nagród lub tp. zmian,
   c) nieprzyznania żadnej nagrody.
10. Na życzenie autorów prace nagrodzone zostaną opublikowane staraniem Komitetu Mikrobiologicznego PAN.

Sekretarz Naukowy
Komitetu Mikrobiologicznego PAN
Prof. Dr *R. Pakuła*

Przewodniczący
Komitetu Mikrobiologicznego PAN
Prof. Dr *K. Bassalik*

WYKAZ KSIĄŻEK

zakupionych przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów dla Biblioteki Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów znajdującej się przy Redakcji Acta Microbiologica Polonica, Wrocław, ul. Siemieńskiego 14/8

1. G. C. Ainsworth and G. R. Bisby, Kew, Surrey, 1954
   A Dictionary of the Fungi

2. Arthur Bracken, London, 1945
   The Chemistry of Microorganisms

3. F. Macfarlane Buret, Cambridge, 1956
   Enzyme, Antigen and Virus

4. Braun, U.S.A.
   Cacterial Genetics

5. Charles Franklin Craig, Philadelphia, 1948
   Laboratory Diagnosis of Protozoan Diseases

6. Philip L. Carpentner, Philadelphia and London, 1956
   Immunology and Serology

7. R. Dujarric de la Rivière, Paris,
   Prophylaxie nationale et internationale des maladies épidémiques

8. Edwin M. Foster, F. E. Nelson, M. L. Speche, R. N. Doetsch and J. C. Olson, New Jersey, 1957
   Dairy Microbiology

9. B. A. Fry, London, 1955
   Methuens Monograph on Biochemical Subjects. The Nitrogen Metabolism of Microorganisms

10. Joseph C. Gilman, Ames Jowa, U.S.A., 1957
    A Manual of Soil Fungi

11. Pierre Gastinel (R. Fasquelle, A. Névot, D. Christol, R. Demanche et P. Nicolle), Paris, 1957
    Précis de Bactériologie Médicale

12. Alfred F. Huettner, New York, 1949
Fundamentals of Comparative Embriology of the Vertebrates

13. John A. Kolmer, New York, 1949
Clinical Diagnosis by Laboratory Examinations

14. Gustaw Kortüm, Berlin-Göttingen, Heidelberg, 1955
Kolorimetrie, Photometrie und Spectometrie

15. J. A. Kolmer, M. D. Spaulding Robinson, London, 1952
Approved Laboratory Technic

16. T. J. Mackie and J. E. McCartney, Edinburg and London, 1956
Handbook of Practical Bacteriology

17. Armand Nèvot, Paris
Contrôle bactériologique practique des denrées alimentaires d'origine animale

18. A. R. Prévot, Paris
Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies

19. E. Joan Stokes, London, 1955
Clinical Bacteriology

20. George Smith, London, 1954
An Introduction to Industrial Mycology

21. Smith and Conant, New York, 1957
Zinsser Bacteriology

22. Kenneth M. Smith, London, 1957
A Textbook of Plant Virus Diseases

23. R. Standfuss, Berlin.
Bacteriologische Fleischbeschau

24. Selman A. Waksman, London, 1952
Soil Microbiology

25. G. E. W. Wolstenholme and Elaine C. P. Millar — Ciba Fundation, London, 1957
The Nature of Viruses

26. G. H. Werkmann and P. W. Wilson, New York, 1951
Bacterial Physiology

27. Wilson G. S. and Miles A. A., London,
Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity

Książki powyższe mogą być wypożyczane przez Oddziały Towarzystwa na podstawie decyzji Zarządu Głównego.

SPIS TREŚCI — CONTENTS — INHALTSVERZEICHNIS

str.

1. R. Stupnicki: Analiza pewnych krzywoliniowych testów mikrobiologicznych.
   Die Analyse nichtelementaren Kurven in gewissen mikrobiologischen Testen. 3
2. Z. Lorkiewicz: Płynna pożywka dla form *L Proteus mirabilis*
   Fluid medium for cultivation of *L* forms of *Proteus mirabilis* 11
3. J. Jeljaszewicz: Badania nad koagulazami gronkowcowymi. I. Metody oznaczania wolnej i związanej koagulazy.
   Some experiments in staphylocoagulase. I. Methods of determination of free and bound coagulase. 17
4. A. Luchter: Badania nad przydatnością metod mikrobiologicznych dla poszukiwania ropy naftowej w rejonie Inowrocławia.
   Some observations on the value of microbiological methods in soil-prospecting in the region of Inowrocław. 35
5. T. Kłosowska: Badania nad bakteriobójczym działaniem borowin.
   Investigations on the bactericidal action of marshes. 45
6. A. Kozłowska: Feststellung von organischen und anorganischen Sälzen in gesunden und mit Virus *X* behafteten Tabakblättern mittels der konduktometrischen Methode.
   Wykrywanie wirusa *X* w liściach tytoniu metodą konduktometryczną. 51
7. K. Kamieńska-Żyła: Wykrywanie wirusa *X* w liściach tytoniu metodą elektroforezy bibułowej.
   Determination of the Virus *X*-protein in tobacco laeves by means of paper electrophoresis. 65
8. Kronika. 73
9. Recenzje. 83
10. Komunikaty. 93

Cena zł 25.—

Warunki prenumeraty

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

Cena w prenumeracie zł 100 rocznie, zł 50 półrocznie. Zamówienia i wpłaty przyjmują:

1. Przedsiębiorstwo Upowszechnienia Prasy i Książki „Ruch", Wrocław, ul. Oławska 10/11, konto PKO nr 8-6-13768.

2. Urzędy pocztowe.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę — 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch", Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100024. Bieżące numery do nabycia w księgarniach naukowych „Domu Książki" i we Wzorcowni PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10.

Informacji w sprawie sprzedaży egzemplarzy z poprzednich lat udziela Centrala Kolportażu „Ruch", Sprzedaż Prasy Zdeaktualizowanej, Warszawa, ul. Srebrna 12, oraz Wzorcownia PWN, Warszawa, ul. Miodowa 10.